



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *L'université Toulouse III – Paul Sabatier*

Discipline : *Biochimie et Biologie Moléculaire*

Présentée et soutenue par **Richard QUEVAL**

Le 20 janvier 2014

Bases Moléculaires des Interactions Pontin-, Reptin-Nucléosome

JURY

Dr. AIT SI ALI Slimane, Directeur de Recherche, Epigénétique et Destin Cellulaire, Paris
Dr. OCHSENBEIN Françoise, Directeur de Recherche, iBiTec-S, Gif-Sur-Yvette
Dr. ROSENBAUM Jean, Directeur de Recherche, Groupe de Recherche pour l'Etude du Foie, Bordeaux
Pr. BYSTRICKY Kerstin, Professeur, LBME, Toulouse
Dr. TROUCHE Didier, Directeur de Recherche, LBCMCP, Toulouse
Dr. HUMBERT Odile, Chargé de Recherche, LBME, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Examineur
Directrice de Thèse

Ecole doctorale *Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse*

Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes – UMR5099
118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex

Directrice de Thèse : **Dr. Humbert Odile**

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du Jury : Slimane AIT SI ALI, Kerstin BYSTRICKY, Françoise OCHSENBEIN, Jean ROSENBAUM et Didier TROUCHE d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Merci aussi de prendre le temps de vous déplacer jusqu'à Toulouse pour discuter de l'un des rôles putatifs des protéines Pontin/Reptin.

Je tiens à remercier Mikhaïl GRIGORIEV et Emmanuel KÄS de m'avoir accepté au sein de leur équipe et de m'avoir fait confiance pour mener au mieux ce projet de thèse. Leurs connaissances scientifiques m'auront permis d'apporter une pierre à l'édifice Pontin/Reptin. Je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont appris.

Je remercie vivement Odile HUMBERT de m'avoir soutenu et guidé tout au long de cette thèse. Tes compétences et ton esprit vif auront permis de parer aux problèmes qui sont survenus sur ce projet. Je te remercie également pour ta patience et tes conseils lors de la rédaction de ce manuscrit et tout au long de cette thèse. Merci d'avoir rendu cette thèse et cette soutenance possible. Je te félicite pour ta récente Habilitation à Diriger des Recherches et te souhaite de transmettre ton savoir à de nombreux autres étudiants.

Je remercie Adilia Dagkessamanskaja. J'ai énormément apprécié de travailler avec toi. Je retiendrai particulièrement les petites discussions que nous avons en fin de journée sur le projet. C'était un vrai bonheur quand tu étais dans l'équipe, tu as une personnalité naturelle qui rend tout plus facile. Je ne suis pas sûr que tu te rendes compte de l'effet positif que tu as sur les personnes avec qui tu travailles tellement pour toi c'est une évidence d'être à l'écoute et de t'intéresser à tout ceux qui t'entourent. J'ai un profond regret de ne pas t'avoir rencontré plus tôt et tu nous as beaucoup manquée suite à ton départ.

Je remercie Nicolas Heddebaut. Encore une fois j'ai vraiment apprécié travailler avec toi pour plusieurs raisons. Pour ta personnalité, simple et très amicale, on sent tout de suite qu'on va se plaire à te côtoyer jour après jour. Pour ton enthousiasme, toujours dans la simplicité ce qui pour moi est une vraie qualité. Tu n'es pas dans le superflu, on voit clairement que tu aimes ce que tu fais simplement. Tu n'es pas en demande de quoi que ce soit, tu es juste généreux dans ta façon travailler. Un autre point clef que j'ai pu ressentir chez toi c'est que tu t'épanouies dans la difficulté ce qui te sera forcément utile dans ton travail future. Tu m'as plusieurs fois surpris par ta rapidité, ta simplicité et ton esprit de synthèse dans tes raisonnements. Bonne continuation.

Je remercie Christophe Normand, ta forte personnalité ne passe pas inaperçue et, même si tu dois en douter, elle égaye les journées de chacun dans le bâtiment. Ça fait du bien de croiser ta tête de râleur qui a toujours un petit sourire en coin. Plus professionnellement, merci d'avoir pris le temps de m'apprendre à me servir des akta.

Je remercie Violette Morales, parce qu'elle est sympa et généreuse et encore une fois ça fait du bien. Tu as toujours été disponible pour m'aider à améliorer mes compétences sur les akta, pour me faciliter la tâche autant que possible en m'invitant sur ton matériel, et surtout, sans ta thèse et tes compétences je n'aurais jamais pu produire et donc purifier les histones (qui « accessoirement » font partie intégrante de mon modèle d'étude). Enfin, plus humainement, tu as essayé de m'encourager à continuer la recherche avec un discours sans prétention, par simple envie de partager, bref par pur générosité. Même si ça n'a pas eu l'effet escompté, merci beaucoup.

Je remercie aussi les précédents thésards, dorénavant docteurs, Christophe Papin et Anna Kalashnikova d'avoir initié les recherches sur ces deux protéines. Sans leurs travaux, je n'aurai pas pu réaliser cette thèse.

Je souhaite aussi remercier ma famille et mes amis pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant tout ce temps. Je tiens particulièrement à remercier mes parents et mon frère, docteur Queval N°1. Merci mon Kako d'être mon grand frère protecteur qui essaie, autant que possible parce que je suis quand même pas facile, de me protéger avec ses conseils avisés d'ainé. Merci aussi d'avoir pris soin de moi pendant ma rédaction, ça m'a fait beaucoup de bien de discuter avec toi pour prendre plus d'assurance.

Je souhaite également remercier celle qui arrive à me donner de l'élan pour faire de moi quelqu'un de meilleur jour après jour. Ma Ludivine, si tu savais tout ce que je te dois. Tu es dotée d'une bonté de cœur démesurée qui me fait beaucoup de bien. Tu m'encourages et me soutiens dans tous mes choix, quels qu'ils soient et tu me mets également quelques coups pieds au cul quand il faut pour me faire avancer dans la bonne direction. J'ai eu la chance de trouver la compagne idéale pour une vie épanouie, pleine d'aventures et de bonheur. Nous nous sommes construits un soutien mutuel essentiel pour une évolution qui ne peut aller que vers le bonheur. Merci mon ti lu. T'aime !

Merci aussi à mon pote Mamate. Grâce à toi j'avais mon super pote près de moi, ce qui fait vraiment du bien au moral, et mes vendredis soir détente (il nous reste le boss de fin de Hunter mon petit pote !). J'ai hâte que tu te poses et qu'on reprenne nos petites sessions, enfin si un jour tu te poses ... et si t'es pas trop loin de moi !

Merci également aux autres membres de ma famille, ma tite Demi et ses remarques très pertinentes lors de la rédaction de ce manuscrit comme « kjolqihdqekfj ckresbkfusssssssssssojkd f e » ou encore « zaesdbvbvtuè !u ». Merci à ma tite Prolac, une petite prozac sur pattes. Mais aussi à mon Hep, Titouille, Touillette, Gaba « regneugneugnagna », mon pote Tipain, mon autre pote Muffin, Néné, Lamoche, Dodo, Salistroupers, et plus récemment Joey. Mais aussi Clafou, Moussakaka, Maka, Ileflot, Dodole, Red, Boom, Orangina...Euh...Opal, Tourtelle et Guinness (« apouapouapouapouapoua »).

Un TRES TRES grand merci au Docteur CHOQUE !, merci mille fois Elodie. Je suis sincèrement stupéfait de tout ce que tu as fait pour moi pendant ma thèse. Je pense particulièrement à l'invitation de N. Proudfoot qui n'aurait jamais pu être fait sans toi à tous les niveaux. Tu es la seule qui a tout donné pour que cet événement puisse avoir lieu, du début à la fin, en supportant mes angoisses et mes craintes (mon anglais aussi ...). Grâce à ta bonté naturelle et ta bonne humeur journalière, cette journée spéciale c'est très bien passée et plus généralement, le temps où nous étions tous les deux en thèse. Ta personnalité est une vraie force pour les gens qui t'entourent (professionnels ou personnels). Tu es capable de pousser les gens en avant pour qu'ils se surpassent, j'en suis la preuve. Ta générosité a encore frappé lors de la rédaction de mon manuscrit. Encore une fois, tu as donnée de ta personne, plus que raisonnablement, pour m'aider à surmonter mes craintes et angoisses et à corriger mon français (les membres du jury devraient d'ailleurs te remercier !).

Et alors là, un spécial merci au M2R GCD 2009/2010. Soyons clairs, lorsque l'on rencontre des gens dans nos évolutions au cours d'une vie, il n'y a que peu de personnes qui retiennent

vraiment notre attention. Plusieurs raisons à cela, un manque d'affinité, un climat professionnel peu (à pas) propice au contact humain comme un climat compétitif, et j'en passe... Mais pendant cette année de M2R on a eu la chance de se découvrir les uns les autres et, comme ça fait du bien d'être entouré d'amis. Toutes les personnes de cette promotion sont celles que l'on a envie d'avoir près de soi, dans les bons moments comme dans les mauvais. Ce sont ces gens qui restent gravés dans nos mémoires. Une des grandes tragédies de ces métiers qui nécessitent une mobilité internationale c'est que l'on finit malheureusement par s'éloigner des gens qu'on aime. Je suis très touché de vous avoir rencontrés et c'est avec un grand pincement au cœur que je finis cette thèse parce que cela m'oblige à m'éloigner de vous. Ainsi je remercie du fond du cœur mon petit couple préféré Sandra et Clément, mon autre ti couple préféré Ismael et Marie, Emilie, Amir, Bibi, Ahmad, Priscillia, Steph.

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler en tant qu'enseignant contractuel à l'UPS. C'était un vrai plaisir de travailler avec vous et je peux vous assurer que toutes ces personnes ont naturellement l'art et la manière de mettre en confiance pour tirer le meilleur de leurs collègues (et en plus ils sont tous vraiment agréables au quotidien !). Ainsi je remercie Patrice Vitali tout particulièrement pour son aide lorsque j'enseignais les TD de Biomol ainsi que Marie-Hélène Rénalier, mais aussi Eric Lacazette, Nathalie Ortega, Vincent Ecochard et Yvan Latapie.

Un grand merci à nos secrétaires qui nous facilitent la vie au quotidien, Safi Delpoux, Isabelle Ringenbach, Cathy Rousseau, et un spécial merci pour Christine Baillat qui m'a beaucoup aidé pour l'invitation de N. Proudfoot.

Enfin, un grand merci à l'ensemble de l'Institut pour les discussions scientifiques et autres que j'ai pu avoir sur les marches du bâtiment équipé de mes indispensables cigarettes et cafés « Richard ». Vos bonjours, vos sourires et vos encouragements auront rythmés les 5 années que j'aurai passées parmi vous. Je pense entre autres à Mathieu Dalvai, Franck Gallardo, Benjamin Albert, Hicham Saad, Mathieu Stouf et Mathieu Berger, François Boudsocq, Gwennaele Fichant, Pierre Geneveux, David Lane, Mick Chandler, Philippe Rousseau, Maud Hertzog, Cheikh-Tidiane Diagne, Christophe Dez, Régine Capeyrou, Sylvain Egloff, Isabelle Goiffon, Anthony Henras, Laurent Lacroix, Anne-Claire Lavigne, Isabelle Leger-Silvester, Célia Plisson-Chastang, Fatima Moutahir, Luca Bellucci, Clément Bellemer, Olivier Cuvier ..., j'ai horreur des remerciements puisqu'il y a tellement de personnes que j'aimerais remercier et que j'en ai forcément oublié, donc pour tous ceux-là, merci beaucoup.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	10
Avant-propos	16
Partie 1 : Introduction	20
Chapitre 1 : Deux protéines essentielles aux fonctions inconnues.	22
Chapitre 2 : Fonction <i>in vivo</i> des protéines Pontin et Reptin	25
I) Les protéines Pontin et Reptin associées au remodelage chromatinien	26
A) La chromatine : nécessité et challenge.	26
1) Le nucléosome	26
• La particule fondamentale du nucléosome	27
2) Modifications de la chromatine et leurs fonctions	31
a) La méthylation de l'ADN	32
b) Modification post-traductionnelle des histones	33
• L'acétylation des histones	33
• La methylation des histones	34
• Autres modifications covalentes d'histones	35
3) Les variants d'histones	36
4) Les complexes de remodelage de la chromatine	37
B) Le complexe INO80	40
1) Le complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin (CDB)	41
a) Vue d'ensemble de la réparation des CDB	41
b) Le complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin chez la Levure.....	43
• Facteurs affectant le recrutement d'INO80 aux CDB	46
• L'activité de remodelage de la chromatine du complexe INO80 aux CDB	47
• INO80 et la résection d'ADN	48
• Implication du complexe INO80 dans la réparation par NHEJ et dans la réparation par RH	49
- Rôle du complexe INO80 dans la réparation par NHEJ :	49
- Rôle du complexe INO80 dans la RH :	50
• Le complexe INO80 participe à l'activation des points de contrôle	52
c) Le complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin chez les eucaryotes supérieurs.....	53
• Rôle du complexe INO80 dans la RH :	53
• Recrutement du complexe INO80 aux CDB	55
• INO80 dans la résection	55
• Un rôle indirect dans la réparation des cassures doubles brin	56

2) Le complexe INO80 dans la régulation de la transcription	56
C) Le complexe SRCAP (SWR1 chez la levure)	58
1) Le complexe SRCAP/SWR1 dans la réparation des cassures double brin.....	60
a) Activité du complexe Swr1 aux abords d'une CDB.....	60
b) Implication du complexe SWR1 dans la réparation par RH et dans la réparation par NHEJ	61
c) SRCAP/SWR1 dans la réparation des cassures double brin chez les eucaryotes supérieurs.....	61
2) Le complexe SRCAP/SWR1 dans la régulation de la transcription.....	62
3) Rôle des protéines Pontin et Reptin dans le complexe SRCAP/SWR1.....	65
D) Le complexe TIP60/NuA4	67
1) Le complexe TIP60 dans la réparation des cassures double brin	68
a) Tip60 détecte l'altération de la chromatine pour activer ATM	70
- Tip60 est un activateur d'ATM	70
- Activation de Tip60 en réponse aux CDB.....	71
- ATM, Tip60 et le complexe MRN	72
b) Le complexe TIP60 et le remodelage de la chromatine aux CDB	74
- Recrutement du complexe TIP60 aux CDB	74
- TIP60 et l'acétylation de la chromatine.....	75
- TIP60 dans l'atténuation du signal de la réparation γ -H2AX.....	76
- Tip60 et l'adaptation des points de contrôle en réponse aux CDB.....	78
2) Le complexe TIP60/NuA4 dans la régulation de la transcription	79
a) NuA4 et la transcription	81
b) Le complexe TIP60 et la régulation de la transcription.....	82
II) Pontin et Reptin associées à des facteurs de transcription.....	83
A) Interaction avec c-Myc	84
1) Pontin et Reptin dans la transformation médiée par c-Myc	84
2) D'une manière générale, Pontin et Reptin favorisent l'activité oncogénique de c-Myc	85
B) Interaction avec E2F1	87
C) Interaction avec β -caténine.....	88
1) Pontin et Reptin dans la transformation médiée par β -caténine	88
2) Un rôle antagoniste des protéines Pontin et Reptin.....	89
3) Les protéines Pontin et Reptin au sein de complexes différents	89
4) Moduler la fonction transcriptionnelle des protéines Pontin et Reptin	91
5) Des modifications post-traductionnelles comme régulateurs de la fonction des protéines Pontin et Reptin	92

III)	Pontin et Reptin dans le complexe R2TP	93
A)	R2TP et l'assemblage des snoRNPs.....	94
1)	Les protéines Pontin et Reptin sont essentielles pour l'assemblage des snoRNPs.....	94
2)	... au sein du complexe R2TP.....	95
B)	R2TP et l'assemblage des kinases de la famille PIKK.....	97
C)	R2TP et l'assemblage de l'ARN polymérase II	99
D)	R2TP dans l'assemblage de la télomérase ?	100
IV)	Division cellulaire	101
Chapitre 3 : Structures et enzymologies des protéines Pontin et Reptin.		103
I)	Structures des monomères extraites de leur assemblage hexamérique:	103
A)	Pontin :	104
B)	Reptin :	104
II)	Structure des hexamères :	106
A)	Structure cristallographique d'un homo-hexamère de la protéine hPontin :	106
1)	Fixation et hydrolyse de l'ATP	106
2)	Fixation d'acide nucléique	108
B)	Structure cristallographique d'un homo-hexamère de la protéine hReptin:	109
1)	Structure de la poche catalytique.....	109
2)	Un canal central pour l'accommodation d'ADN double brin	111
3)	Une particularité Reptinienne ?!.....	111
C)	Hétéro-hexamères γ Pontin- γ Reptin :	111
1)	Les cofacteurs nucléotidiques entraînent un changement de conformation de l'hétéro-hexamère.	113
2)	Peut-on vraiment parler d'hétéro-hexamère ?	113
III)	Structures des dodécamères :	115
A)	Structure cristallographique d'un dodécamère hPontin-hReptin :	116
1)	Structure global du dodécamère	116
2)	Interaction entre les protomères	116
3)	Structure du canal central	118
4)	Structure de la poche catalytique.....	118
B)	Différentes conformations dodécamériques :	119
1)	Un dodécamère compact	119
a)	Reconstitution tridimensionnelle similaire à la structure cristallographique	119
b)	Une conformation rendant l'OB-fold accessible	121
2)	Dodécamères étendus	121

• L'OB-fold n'est plus accessible pour les dodécamères étendus.....	123
3) Entre une conformation compacte et une conformation étendue	125
4) Un dodécamère dissymétrique	127
IV) Et si chaque structure portait une fonction spécialisée.....	129
A) Comment expliquer les différences observées entre les différentes structures des protéines Pontin et Reptin?.....	129
B) Chaque niveau d'assemblage oligomérique porte des activités enzymatiques qui lui sont propres.....	135
1) Une enzymologie controversée	135
2) La controverse est levée lorsque l'on s'intéresse au niveau d'assemblage oligomérique des protéines Pontin et Reptin	135
Partie 2 : Résultats	140
I) Article : REPTIN AND PONTIN FUNCTIONS ARE DIRECTED BY H3-TAIL INTERACTION AND MODIFICATION	142
A) Question posée et démarches expérimentales	142
B) Résultats	143
II) L'activité hélicase des protéines Pontin et Reptin est-elle suffisante pour déstabiliser un nucléosome ?	182
A) Question posée et démarches expérimentales	182
B) Matériels et méthodes.....	183
C) Résultats et discussions	185
Conclusion et perspectives	188
Références	200

Avant-propos

Ce manuscrit présente le travail de caractérisation biochimique des protéines eucaryotes Pontin et Reptin en interaction avec les constituants de la chromatine, les nucléosomes et les histones. Aussi, l'introduction est initiée par une brève description de ces protéines en insistant sur les points bibliographiques clefs mettant en lumière la nécessité de déterminer le ou les mécanismes moléculaires qui régissent ces protéines. Notre travail montre clairement que les protéines Pontin et Reptin peuvent être connectées à la chromatine par leur interaction avec les nucléosomes et plus particulièrement avec l'histone H3. L'introduction se poursuit donc par une description succincte de la chromatine en insistant sur son unité de base, le nucléosome, et sur les constituants protéiques du nucléosome, les histones. A l'issue de nos recherches nous pouvons proposer un mécanisme permettant d'expliquer comment les protéines Pontin et Reptin peuvent être retrouvées dans différents complexes qui agissent dans des processus liés à la chromatine tels que la réparation de l'ADN ou la transcription. Ainsi, il m'a paru nécessaire de présenter une vue d'ensemble des différentes données rassemblées sur les fonctions biologiques des protéines Pontin et Reptin et de leurs complexes associés, en m'attachant particulièrement aux complexes directement connectés avec la chromatine. L'ensemble de nos résultats mettent en évidence un mécanisme à l'échelle moléculaire singulier pour les protéines Pontin et Reptin, impliquant leur différents niveaux d'assemblages oligomériques et leurs propriétés enzymatiques. L'introduction se termine par une analyse des différentes données structurales obtenues pour ces protéines ainsi que leurs propriétés enzymatiques.

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : Deux protéines essentielles aux fonctions inconnues.

En 1997, l'équipe de Tamura isole pour la première fois la protéine Pontin par co-immunoprécipitation ciblée sur le facteur général de transcription TBP (« TATA Binding Protein ») (Kanemaki *et al.*, 1997). Deux ans plus tard, cette même équipe publie leurs travaux sur l'isolation de la protéine Reptin après l'analyse de séquences d'une banque d'EST (« Expressed Sequences Tag ») à partir de la séquence de Pontin (Kanemaki *et al.*, 1999). Dès lors, plusieurs groupes ont pu identifier ces deux protéines dans de nombreux processus cellulaires aussi divers que variés tels que le remodelage de la chromatine, la transcription, la réparation des dommages à l'ADN, la maturation des snoARN, l'assemblage de l'ARN polymérase II, l'assemblage de la télomérase, la stabilisation des protéines « phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases », l'apoptose ou encore la division cellulaire (Bauer *et al.*, 2000 ; Huen *et al.*, 2010 ; Ikura *et al.*, 2000 ; Jónsson *et al.*, 2001 ; Jónsson *et al.*, 2004 ; Kanemaki *et al.*, 1999 ; Krogan *et al.*, 2003 ; McKeegan *et al.*, 2007 ; Ohdate *et al.*, 2003 ; Shen *et al.*, 2000 ; Watkins *et al.*, 2004). C'est probablement cette multiplicité de rôles qui explique que chacune de ces protéines s'est vue attribuer un large panel de noms. Pontin est également connue sous le nom de Rvb1, RuvBL1, Tip49a, Tip49, ECP-54, Tih1, p50 ou Tap54 β ; Reptin, quant à elle, est aussi appelée Rvb2, RuvBL2, Tip49b, Tip48, ECP-51, Tih2, p47 ou Tap54 α . Tout au long de ce manuscrit, je m'en tiendrai aux dénominations Pontin et Reptin en accord avec la décision de simplification de la nomenclature du « First International Workshop on Pontin (RUVBL1) and Reptin (RUVBL2) » (Rosenbaum *et al.*, 2013). Le nom des protéines sera précédé de la lettre « h », « y », « r », « d », « x » et « at » suivant qu'il s'agisse respectivement de protéines humaines, de levure (« yeast »), de rat, de drosophile, de xénope ou d'*Arabidopsis thaliana* respectivement.

Les protéines Pontin et Reptin sont soumises à une forte pression de sélection qui se caractérise par le haut niveau de conservation de ces protéines. Les orthologues humaines et de levures présentent 70% d'identité. Elles sont également très similaires entre elles avec pas moins de 40% d'identité entre les deux paralogues Pontin/Reptin d'une même espèce. Malgré cette forte homologie de séquence, ces deux protéines ne se complètent pas. Elles peuvent même avoir des rôles antagonistes en particulier dans la régulation transcriptionnelle. Souvent retrouvées ensemble au sein d'un même complexe, elles peuvent toutefois agir séparément

mais toujours complexées à d'autres protéines. C'est probablement la variété des processus cellulaires dans lesquels les protéines Pontin et Reptin sont impliquées qui explique qu'elles sont essentielles chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kanemaki *et al.*, 1999 ; King *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2000 ; Qiu *et al.*, 1998), *Drosophila melanogaster* (Bauer *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Holt III *et al.*, 2002) et *Caenorhabditis elegans* (Matias *et al.*, 2006). Ces protéines sont ubiquitaires, avec une surreprésentation dans le thymus et les testicules (Kanemaki *et al.*, 1999 ; Makino *et al.*, 1999 ; Parfait *et al.*, 2000 ; Salzer *et al.*, 1999). L'expression des protéines Pontin et Reptin est vitale au cours du développement chez les mammifères, les plantes et le poisson zèbre (Chauvet *et al.*, 2005 ; Holt III *et al.*, 2002 ; Rottbauer *et al.*, 2002). Surexprimées dans de nombreux types de cancer (OncomineTM) comme les carcinomes hépatocellulaires (Haurie *et al.*, 2009 ; Ménard *et al.*, 2010 ; Rousseau *et al.*, 2007), le cancer colorectal (Carlson *et al.*, 2003 ; Lauscher *et al.*, 2007), le cancer gastrique (Li *et al.*, 2010), le cancer du rein (Ren *et al.*, 2012) ou encore le cancer du sein (Maslon *et al.*, 2010), il est de plus en plus évident que les protéines Pontin et Reptin participent activement à certains processus de transformation et d'invasion cellulaire. Le rôle des protéines Pontin et Reptin dans ces processus s'explique, au moins en partie, par leurs fonctions co-activatrices ou co-repressives de facteurs de transcription oncogéniques tels que c-Myc ou β -caténine (pour revue Grigoletto *et al.*, 2011).

Les protéines Pontin et Reptin jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire ou encore la stabilité du génome. Par conséquent, la dérégulation de leurs expressions est liée à une grande variété de maladies humaines, incluant le cancer et l'auto-immunité. Etant donné l'importance des protéines Pontin et Reptin dans un grand nombre de processus biologiques, la bonne compréhension de leur mécanisme moléculaire pourrait fournir des indications fondamentales pour des implications thérapeutiques. Bien que de nombreuses études se soient penchées sur l'implication des protéines Pontin et Reptin dans tous les processus cellulaires auxquels elles appartiennent, notre connaissance du mécanisme moléculaire des protéines Pontin et Reptin reste indubitablement insuffisante. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette méconnaissance. Bien souvent la fonction de protéines peut être envisagée par la relation qu'elles présentent avec leurs structures. Or comme nous le verrons, les études structurales des protéines Pontin et Reptin sont très controversées. Elles peuvent former différents assemblages oligomériques stables l'une et l'autre mais également l'une avec l'autre (Cheung *et al.*, 2010 ; Gorynia *et al.*,

2011 ; Gribun *et al.*, 2008 ; Ikura *et al.*, 2000 ; López-Perrote *et al.*, 2012 ; Matias *et al.*, 2006 ; Niewiarowski *et al.*, 2010 ; Petukhov *et al.*, 2012 ; Puri *et al.*, 2007 ; Torreira *et al.*, 2008). Sans doute en conséquence de cette diversité de structures possibles, leurs propriétés enzymatiques sont également très largement débattues. Les protéines Pontin et Reptin possèdent les motifs et la morphologie typiques de la superfamille de protéines AAA+ (ATPase Associées à diverses Activités cellulaire) tels que les boîtes Walker A et Walker B qui permettent la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. De plus une homologie, restreinte aux motifs AAA+, avec la protéine bactérienne RuvB (hélicase AAA+ essentielle pour le mécanisme de recombinaison bactérien) fait des protéines Pontin et Reptin des hélicases hexamériques putatives. Pour autant, suivant les études menées sur ces protéines, les activités ATPase, intrinsèque ou ADN-dépendante, et hélicase ne sont pas toujours observées. En effet, elles sont décrites comme inactives (Qiu *et al.*, 1998; Gorynia *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2006), ATPases ADN-indépendantes (Choi *et al.*, 2009 ; Gribun *et al.*, 2008 ; Ikura *et al.*, 2000 ; Niewiarowski *et al.*, 2010 ; Puri *et al.*, 2007 ; Torreira *et al.*, 2008), ATPases ADN-dépendantes (Elkaim *et al.*, 2012 ; Kanemaki *et al.*, 1999 ; Makino *et al.*, 1999 ; Papin *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011), et hélicase ATP-dépendantes (Kanemaki *et al.*, 1999 ; Makino *et al.*, 1999 ; Papin *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011). Enfin, pour tous les processus impliquant les protéines Pontin et Reptin, on les retrouve toujours complexées à de nombreuses protéines rendant difficile l'accès à la fonction propre des protéines Pontin et Reptin au sein de ces complexes. De plus, les protéines Pontin et Reptin sont retrouvées aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Dans ces compartiments, elles sont au cœur de processus très différents tels que la réparation des dommages à l'ADN dans le noyau et l'assemblage de l'ARN polymérase II dans le cytoplasme. Autant une activité hélicase peut facilement se concevoir dans le traitement de l'ADN lésé, autant cette même activité est difficilement intégrable à l'assemblage d'un complexe protéique dépourvu d'acide nucléique.

Dans cette introduction, nous discuterons de la relation structure/fonction des protéines Pontin et Reptin en revisitant les différentes données structurales, enzymologiques et fonctionnelles de ces protéines accumulées depuis maintenant 16 ans.

Chapitre 2 : Fonction *in vivo* des protéines Pontin et Reptin

Si les études structurales et enzymologiques des protéines Pontin et Reptin sont encore très débattues, l'investigation de leurs fonctions *in vivo* est plus cohérente. Pontin et Reptin sont toutes deux essentielles chez la levure, des souches dépourvues de chacun de leurs gènes ne sont pas viables (Kanemaki *et al.*, 1999 ; King *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2000 ; Qiu *et al.*, 1998 ; Radovic *et al.*, 2007). Dans des cellules embryonnaires de xénope, la déplétion de Pontin et Reptin réduit la prolifération cellulaire jusqu'à la létalité (Etard *et al.*, 2005). Dans la lignée cellulaire de drosophile S2 (Björklund *et al.*, 2006 ; Ducat *et al.*, 2008) ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires humaines (Ducat *et al.*, 2008 ; Haurie *et al.*, 2009 ; Ménard *et al.*, 2010 ; Rousseau *et al.*, 2007 ; Watkins *et al.*, 2002), les protéines Pontin et Reptin sont également requises pour la croissance cellulaire. De plus, la surexpression de yPontin ou yReptin est toxique chez la levure (Sopko *et al.*, 2006), et des souches diploïdes hétérozygotes pour yPontin ou yReptin sont haploinsuffisantes pour la réparation des dommages de l'ADN (Radovic *et al.*, 2007).

Il n'est donc pas surprenant que les protéines Pontin et Reptin jouent un rôle clef dans de nombreux processus cellulaires. Pour tous les processus cellulaires auxquels elles appartiennent, les protéines Pontin et Reptin sont toujours retrouvées associées à de nombreuses protéines, souvent aux seins de macrocomplexes. Les protéines Pontin et Reptin sont au cœur des complexes de remodelage de la chromatine de la famille INO80. Au sein de ces complexes, elles sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle et la réparation des cassures double brin. Indépendamment de leur présence dans ces complexes de remodelage, elles participent à la régulation transcriptionnelle, la prolifération cellulaire et l'invasion cellulaire par leurs interactions avec de nombreux facteurs de transcription tels que c-Myc ou β -caténine. Elles sont aussi membres du complexe R2TP identifié chez l'homme et la levure. Ce complexe est requis pour l'assemblage des snoRNPs, de la Polymérase II et est impliqué dans la régulation des protéines PIKKs. Les protéines Pontin et Reptin ont été retrouvées associées au complexe γ TURC (pour « γ -Tubulin Ring Complex »), les impliquant dans le processus de division cellulaire. Enfin, ces protéines ont également été identifiées comme nécessaires à l'assemblage du complexe télomérase.

Ce chapitre est consacré à la présentation des différents complexes contenant les protéines Pontin et Reptin. Ainsi, en s'appuyant sur les preuves expérimentales démontrant

que Pontin et Reptin sont nécessaires aux fonctions de ces complexes, nous discuterons du rôle que peuvent avoir ces protéines en leur sein.

I) Les protéines Pontin et Reptin associées au remodelage chromatinien

A) La chromatine : nécessité et challenge.

Chez les eucaryotes, la longueur de l'ADN présente un challenge topologique certain pour que l'ADN puisse être empacté dans le noyau des cellules. Chez l'homme par exemple, environ 2 mètres d'ADN doivent être maintenus dans un noyau d'environ 10 µm de diamètre. A notre échelle, cela consisterait à faire rentrer 20 km de fil dans une balle de tennis. Pour résoudre ce problème, la nature a choisi d'empaqueter le génome par l'intermédiaire de protéines spécialisées (principalement les histones). Le complexe nucléoprotéique résultant est nommé chromatine dont l'unité de base est le nucléosome.

1) Le nucléosome

Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine. Il est composé d'une particule fondamentale (ou NCP pour « Nucleosome core particle ») et d'une région liante (ou région inter-nucléosomale) qui relie deux particules fondamentale adjacentes. La taille de la région inter-nucléosomale varie suivant l'espèce considérée et le type cellulaire. La taille totale de l'ADN dans le nucléosome peut varier de 160 à 241 paires de bases suivant l'espèce considérée (Compton *et al.*, 1976 ; Morris, 1976 ; Noll, 1976 ; Spadafora *et al.*, 1976 ; Thomas et Thompson, 1977).

Le NCP est formé d'un octamère protéique contenant deux copies de chaque protéine histone H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel 146-147 paires de bases d'ADN s'enroulent sur 1,65 tour en super-hélice gauche (Arents *et al.*, 1991). Un octamère d'histone complet est composé d'un tétramère d'histone (H3-H4)₂ central flanqué par deux dimères d'H2A-H2B. Les quatre histones fondamentales sont de petites protéines basiques (11 à 16 kDa), lesquelles sont hautement conservées au cours de l'évolution. Les histones induisent une courbure structurale des sillons majeurs et mineurs de l'ADN se traduisant par une compression et une réduction lorsqu'ils sont face à l'octamère et un élargissement lorsqu'ils pointent vers l'extérieur du NCP (Travers, 1990).

Le nucléosome est stabilisé par des interactions histones-ADN lesquelles se produisent toutes les 10 paires de bases, entraînant une distorsion impressionnante de l'hélice d'ADN. La structure finale est stabilisée par 116 contacts directs entre les histones et l'ADN et 358 pont impliquant des molécules d'eau qui stabilisent ces interactions histones-ADN (Längst et Becker, 2004). Les connexions entre l'ADN et les histones sont principalement non-spécifiques et incluent des interactions non-polaires avec les groupements pentoses de l'ADN, des ponts hydrogènes avec les groupements phosphates de l'ADN et des interactions électrostatiques entre les charges positives des histones et les charges négatives du squelette de phosphates de l'ADN (Widom, 1997).

L'association d'une molécule d'histone de liaison H1 avec le NCP conduit au nucléosome ou chromatosome qui lui contient 167 pb d'ADN (Simpson, 1978). Les nucléosomes sont connectés les uns aux autres pour former une chaîne de nucléosomes, laquelle peut se structurer en fibres de 30nm et d'autres structures chromatinienne hautement organisées.

- *La particule fondamentale du nucléosome*

La particule fondamentale (**Figure 1**) est la structure cristallisable du nucléosome canonique (Harp *et al.*, 2000), défini par le profil de protection de l'ADN par l'octamère d'histones suite à une digestion de la chromatine par des nucléases. Les 205 kDa du NCP contiennent deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 et 146-147 paires de bases d'ADN enroulées sur 1,65 tour en une super-hélice autour des histones. Des études de « neutron scattering » (Bentley *et al.*, 1984) et de cristallographie au rayon X à basse résolution (7Å) (Finch *et al.*, 1981 ; Richmond *et al.*, 1984 ; Uberbacher et Bunick, 1989) ont démontré la forme en disque du NCP. Cependant, les détails fins de la structure à haute résolution ont été possibles seulement après la résolution de la structure à 3.1Å de l'octamère d'histones (Arents *et al.*, 1991) et de la structure à 2.8 Å du NCP (Luger *et al.*, 1997) utilisant 146 paires de bases d'ADN palindromique d' α -satellite du chromosome X et des protéines histones recombinantes marquées avec des atomes lourds. Une structure raffinée du NCP utilisant 146 paires de bases d'ADN palindromique d' α -satellite et des octamères d'histones natifs de poulet a démontré l'asymétrie du NCP à une résolution de 2.5 Å (Harp *et al.*, 2000). L'octamère d'histone peut être assimilé à un assemblage tripartite. Lorsque l'on regarde directement dans l'axe de la dyade (**Figure 1**), on trouve au centre le tétramère (H3-H4)₂ en forme de V flanqué de deux boules aplaties, les dimères d'H2A-H2B. La surface de

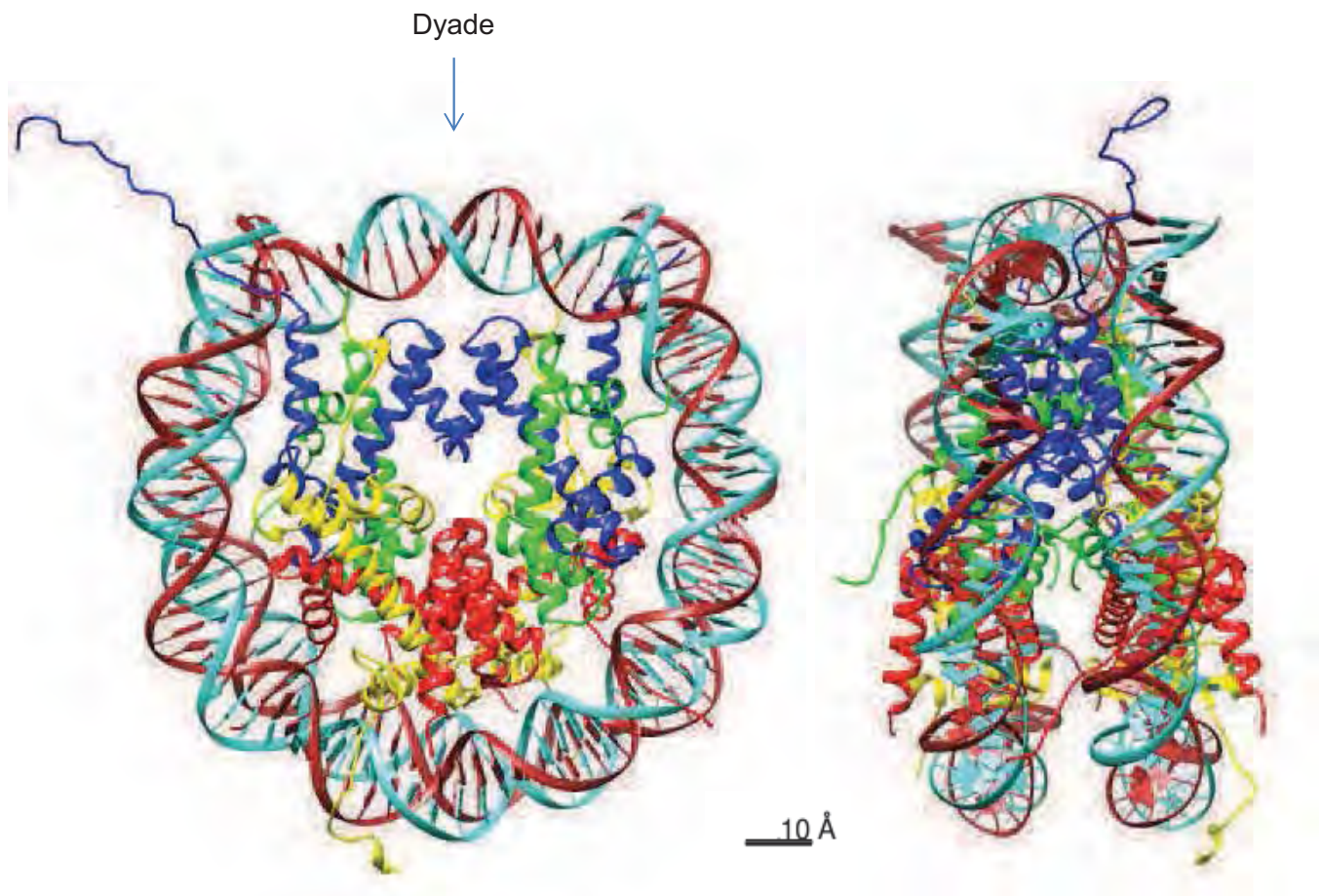


Figure 1: Particule fondamentale du nucléosome (code PDB : 1AOI). Le squelette phosphodiester des 146 paires de bases d'ADN (marron et turquoise) ainsi que les huit protéines histones (bleu pour H3, vert pour H4, jaune pour H2A et rouge pour H2B) sont représentées en ruban. La vue de gauche est dans l'axe passant au centre de la super hélice d'ADN tandis que la vue de droite est parallèle à l'axe passant au centre de la super hélice d'ADN.

Images relayées avec le logiciel Chimera (1.8)
<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

l'octamère comporte plusieurs sillons et crêtes qui permettent la formation de la super-hélice gauche de la double hélice d'ADN. Individuellement, chaque histone présente comme caractéristique commune un motif hélice-tour-hélice appelé motif « histone fold » (**Figure 2**). Ce motif est composé de trois hélices : une courte hélice sur le côté N-terminal (NH), une longue hélice médiane (mH) et une courte hélice sur le côté C-terminal (CH). Les hélices sont rejointes par une boucle NL entre l'hélice NH et l'hélice mH et une boucle CL entre les hélices mH et CH. Le motif « histone fold » médie les interactions histone-histone ainsi que les interactions histones-ADN. L'organisation de l'octamère est directement responsable de l'agencement des 146-147 paires de bases d'ADN, chaque assemblage de paires d'histones associe 27-28 paires de bases d'ADN principalement en fixant le squelette phosphodiester de l'ADN qui fait face aux protéines.

L'assemblage par paires en hétérodimères des histones s'effectue par un motif nommé « poigné de mains » dans lequel les deux monomères sont intimement associés d'une manière tête-à-queue principalement maintenue par des interactions hydrophobes (Arents *et al.*, 1991 ; Luger *et al.*, 1997). Les hélices terminales courtes sont pliées de telle sorte qu'elles croisent l'hélice médiane et cette disposition est stabilisée par des interactions principalement hydrophobes entre les hélices (**Figure 2**). On trouve également des ponts β entre les boucles CL d'H2A et NL d'H2B et entre les boucles CL d'H3 et NL d'H4 au sein des hétérodimères. Ces ponts constituent les sites d'accueil primaires pour l'ADN sur la surface des histones.

Les hélices médiane et C-terminale de deux histones H3 (à partir de deux dimères H3-H4) interagissent pour former un paquet de quatre hélices qui assiste la formation de l'hétérotétramère (H3-H4)₂. La forme du tétramère ressemble à un fer à cheval ouvert tordu (Arents *et al.*, 1991 ; Luger *et al.*, 1997 ; Xie *et al.*, 1996) et détermine le positionnement des nucléosomes. Le tétramère (H3-H4)₂ interagit plus fortement avec l'ADN que le dimère H2A-H2B. Pour compléter l'octamère, deux dimères H2A-H2B se lient aux deux côtés opposés du tétramère pour former la structure tripartite.

Les histones ont également un domaine amino-terminal fortement basique non structuré qui s'étend à partir de la surface du nucléosome (Arents et Moudrianakis, 1995 ; Ramakrishnan, 1995). Ces extrémités N-terminales d'histones sont des cibles pour des modifications post-traductionnelles et sont importantes pour l'organisation structurale de la

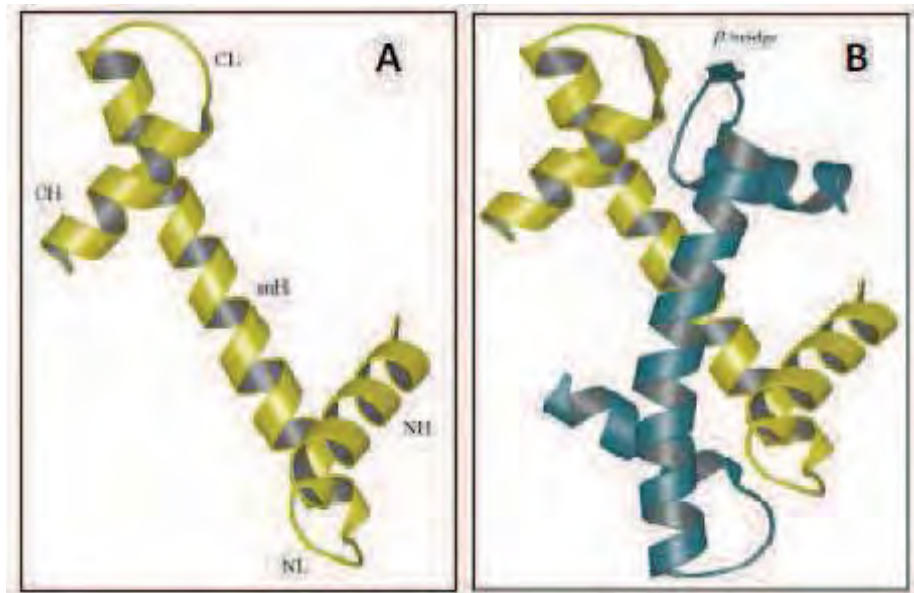


Figure 2 : (A) Domaine « histone fold » de l’histone H3 représenté en ruban. (B) Hétérodimère H3-H4 montrant l’interaction en poigné de mains.

D’après Harp *et al.* (2000) *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**(Pt 12):1513-34.

chromatine. Elles passent aux travers des sillons de l'ADN, ce qui suppose qu'elles conditionnent la conformation définitive de l'ADN une fois liées. De plus, elles sont rapportées comme impliquées dans des interactions interparticulaires et également avec l'ADN de liaison (Angelov *et al.*, 2001).

L'organisation de l'octamère d'histones favorise le placement des chaîne latérales d'arginine des histones qui forment une rampe pour les sillons mineurs de l'ADN favorisant son enroulement superhélicoïdale gauche avec un espacement des sillons mineurs plus ou moins régulier le long de cette rampe.

La fonction du nucléosome est paradoxale, il est requis pour jouer deux rôles opposés simultanément. D'une part, les nucléosomes doivent être stables, abritant l'ADN, le compactant et le protégeant des dommages. D'autre part, les nucléosomes doivent être suffisamment labiles pour permettre aux informations contenues dans l'ADN d'être utilisées par les machineries moléculaires impliquées dans les transactions de l'ADN tels que la réplication la transcription ou la réplication.

2) Modifications de la chromatine et leurs fonctions

La compaction de la chromatine crée un environnement relativement inaccessible pour la fixation des protéines régulatrices de l'ADN. La chromatine a donc besoin d'être dynamique pour permettre la régulation des processus nucléaires dépendants de l'ADN tels que la transcription, la réplication ou la recombinaison homologe (Horn et Peterson, 2002). Il est important de retenir que la chromatine au sein du noyau est une structure multi-échelle dont le premier niveau de repliement est le nucléosome. On observe d'ailleurs dans le noyau deux types de domaines chromatinien : l'hétérochromatine, dans laquelle l'ADN est très condensé, et l'euchromatine qui est moins compacte et qui regroupe la quasi-totalité des gènes transcrits de façon active.

Même au sein de ces deux domaines la structure de la chromatine doit être régulée, pour donner ou interdire l'accès à tels ou tels gènes, ou bien pour s'organiser d'une façon propre à la phase du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule. Pour permettre cette dynamique de la chromatine, la cellule a développé quatre mécanismes basiques pour moduler la structure de la chromatine au niveau moléculaire. Ces mécanismes sont la méthylation de l'ADN, la modification post-traductionnelle des histones, l'incorporation de variants d'histones et le remodelage ATP-dépendant de la chromatine.

a) La méthylation de l'ADN

Les séquences d'ADN peuvent être méthylées sur les cytosines, principalement au niveau de dinucléotides CG (appelés CpG) chez les mammifères. Un groupement méthyl est alors attaché de façon covalente sur le carbone 5 de la cytosine. La méthylation de l'ADN sur les CpG est retrouvée dans tout le génome, notamment au niveau des transposons, des éléments répétés et du corps des gènes, mais aussi sur certains promoteurs. Le génome de mammifère est majoritairement méthylé, cependant il est ponctué de zones non méthylées, en particulier des séquences riches en GC, appelées îlots CpG. Ces séquences d'environ 1000 pb recouvrent 60 à 70% des régions promotrices chez l'humain. Ces îlots CpG non méthylés marquent les gènes actifs en transcription (Deaton et Bird, 2011). En revanche, certains îlots CpG sont méthylés, résultant en la répression stable du gène associé. De façon générale, la méthylation de l'ADN est donc considérée comme répressive de la transcription, permettant ainsi l'expression correcte de gènes spécifiques de tissus mais aussi la mise en silence de séquences comme les transposons (Suzuki et Bird, 2008).

La méthylation de l'ADN est mise en place par des enzymes spécifiques, les DNA méthyltransférases (DNMTs). Il existe deux familles de DNMTs, qui sont un peu différentes en termes de structure et de fonctions, assurant la mise en place ou le maintien de la méthylation de l'ADN. Chez les mammifères, les DNMTs sont au nombre de 4. La famille des DNMT3 regroupe les méthyltransférases « de novo », qui établissent le patron de méthylation. Cette famille comporte deux enzymes catalytiquement actives, DNMT3a et DNMT3b, et un facteur régulateur, DNMT3- Like (DNMT3L). DNMT3L interagit avec DNMT3a ou DNMT3b et permet d'augmenter leur activité enzymatique, agissant ainsi comme un régulateur de la méthylation de novo de l'ADN. La protéine DNMT1 est quant à elle une méthyltransférase « de maintien », qui permet de rétablir la méthylation des deux brins de l'ADN lors de la réplication (méthylation du brin néosynthétisé). Cette enzyme va donc avoir pour substrat des CpG hémiméthylés.

La méthylation de l'ADN empêche la liaison de certains facteurs de transcription afin d'inhiber l'initiation de la transcription. D'autre part, les DNMTs elles-mêmes permettent le recrutement de complexes répresseurs contenant des activités de modification de la chromatine, comme des histones méthyl-transférases et des histones déacétylases.

b) Modification post-traductionnelle des histones

Bien que découvertes il y a 50 ans (Allfrey *et al.*, 1964 ; Phillips, 1963), les modifications post-traductionnelles (PTM pour « Post-Transcriptionnels Modifications ») covalentes des histones ont pris beaucoup d'importance ces dix dernières années où elles ont été impliquées dans toutes les transactions de l'ADN (Kouzarides, 2007). Les PTMs des histones sont principalement retrouvées sur leur extrémité N-terminale flexible en plus de celles retrouvées sur leur domaine histone-fold et leur région C-terminale (Hyland *et al.*, 2005). Les PTMs situées sur l'extrémité N-terminale des histones peuvent moduler les capacités régulatrices des nucléosomes en affectant la fixation de protéines effectrices aux histones, tandis que les modifications sur les domaines histone-fold peuvent directement altérer la structure des nucléosomes (Latham et Dent, 2007).

Ces modifications peuvent servir de cibles pour des modules protéiques de reconnaissance de ces modifications, comme les bromodomains qui reconnaissent les lysines acétylées (Dhalluin *et al.*, 1999 ; Jacobs et Khorasanizadeh, 2002), et les chromodomains qui reconnaissent les lysines méthylées (Jacobs et Khorasanizadeh, 2002 ; Min *et al.*, 2003). Il y a au moins huit types distincts de modifications retrouvées sur plus de soixante résidus sur les histones, incluant les acétylations (Sternier et Berger, 2000 ; Zhang et Reinberg, 2001), les phosphorylations (Nowak et Corces, 2004), les monoubiquitinations (Shilatifard, 2006), les sumoylations (Nathan *et al.*, 2006), les ADP-ribosylations (Hassa *et al.*, 2006), les déiminations (Cuthbert *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004) et les isomérisations de prolines (Nelson *et al.*, 2006). Ces modifications sont dynamiques, pour la plupart réversibles et ont des fonctions spécifiques dans les processus nucléaires ADN-dépendants (Fischle *et al.*, 2003 ; Iizuka *et al.*, 2006 ; Khorasanizadeh, 2004).

- ***L'acétylation des histones***

L'acétylation des histones est médiée par les histones acétyltransférases (HAT pour « Histone Acetyl Transférase »), lesquels catalysent le transfert des groupements acétyles depuis l'acetyl-CoA sur les groupements ϵ -amino terminaux des résidus lysines spécifiques, principalement sur les régions N-terminales des histones avec pour exception la protéine de

levure SPT10 découverte récemment qui permet l'acétylation de la lysine 56 de l'histone H3 située sur les promoteurs de gènes (Xu *et al.*, 2005). Les acétyltransférases sont divisées en trois familles, GNAT, MYST et CBP/P300 (Sterner et Berger, 2000), lesquelles modifient plus d'une lysine mais quelques lysines spécifiques ont pu être détectées. Le processus de déacétylation est effectué par d'autres groupes de molécules appelées histones déacétylases (HDAC pour Histone DeACetylase») lesquelles ont été observées dans plusieurs cas pour fonctionner dans la répression des gènes. Cependant la déacétylation d'histones a également été décrite dans l'activation transcriptionnelle dans quelques cas (Kurdistani et Grunstein, 2003 ; Robyr *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002). L'acétylation est presque toujours associée avec l'activation de la transcription et a été retrouvée comme jouant un rôle dans l'assemblage de la chromatine, la condensation des chromosomes, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la recombinaison VDJ et la compensation de dose chez la drosophile (Kouzarides, 2007 ; Iizuka et Smith, 2003). Les HAT peuvent aussi acétyler des protéines non-histones (*e.g.* la protéine suppresseur de tumeur p53 ou le facteur de transcription UBF) et de ce fait influencer leurs fonctions (Gu et Roeder, 1997 ; Pelletier *et al.*, 2000).

- *La méthylation des histones*

La méthylation est la PTM la mieux caractérisée à ce jour, probablement en raison de la nature hautement spécifique des méthyltransférases. Les méthyltransférases peuvent se diviser en deux groupes, les lysines méthyltransférases et les arginines méthyltransférases. Les lysines méthyltransférases catalysent le transfert de un à trois groupement méthyle à partir de S-adenosylmethionine sur le groupement ϵ -amino terminal d'un seul résidu lysine créant ainsi des lysines mono-, di- ou triméthylées. Les arginines méthyltransférases quant à elles génèrent des résidus arginines mono- ou diméthylés, symétriquement ou asymétriquement, en transférant un groupement méthyl sur le groupement guanidine (Kouzarides, 2002).

Bien que la méthylation ait été découverte il y a 45 ans (Murray, 1964), c'est seulement en 2004 que la première déméthylase de lysine d'histone (LSD1 pour « Lysine-Specific Demethylase 1») a été décrite pour déméthyliser la lysine 4 de l'histone H3 mono- et diméthylé mais pas triméthylé (Shi *et al.*, 2004). LSD1 est aussi capable de retirer un ou deux groupement méthyle de la lysine 9 de l'histone H3 (Metzger *et al.*, 2005). Par ailleurs, une histone déméthylase contenant un domaine JmjC (JHDM1) a récemment été identifiée pour

catalyser la deméthylation de la lysine 36 de H3 mono- ou diméthylée (Tsukada *et al.*, 2006). Les groupements monométhyles de l'arginine sont éliminés par l'intermédiaire de la déiminase peptidylarginine (PAD4), dans lequel la méthylarginine est convertie en citrulline (Wang *et al.*, 2004).

La méthylation a été décrite aussi bien dans l'activation que dans la répression transcriptionnelle dans différentes situations. La méthylation de la lysine 4, la lysine 36 et la lysine 79 de l'histone H3 (Beisel *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2003 ; Santos-Rosa *et al.*, 2002) a été observée dans l'activation de gène, alors que la di- et triméthylation de la lysine 9 ou 27 de l'histone H3 (Bannister *et al.*, 2002 ; Cao *et al.*, 2002 ; Czermin *et al.*, 2002 ; Lachner *et al.*, 2001) ont été décrites dans la mise en silence de gènes. Il est montré que la di- et triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est une « plateforme d'accueil » pour HP1 (pour « Heterochromatin Protein 1 »), indiquant un rôle de ces modifications dans l'établissement de l'hétérochromatine (Peters *et al.*, 2003 ; Schotta *et al.*, 2004). De même, la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 facilite la fixation de Polycomb (Brehm *et al.*, 2004), une protéine impliquée dans le maintien de la mise en silence des gènes homéotique durant le développement.

- *Autres modifications covalentes d'histones*

D'important progrès ont été réalisés pour comprendre le rôle de la phosphorylation dans de nombreux processus tels que la transcription, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la condensation de la chromatine (Cheung *et al.*, 2000 ; Grant, 2001). La phosphorylation des sérines 10 et 28 de l'histone H3 est bien documentée pour se produire durant la mitose en métaphase et est importante pour la condensation des chromosomes mitotiques (Goto *et al.*, 1999). La phosphorylation d'H3 est aussi connue pour se produire après l'activation des voies de signalisation des dommages de l'ADN et a un rôle pour faciliter la réparation de l'ADN. La phosphorylation est aussi décrite sur un variant de l'histone H2A, H2AX, suite à l'exposition de la cellule à des agents causant des dommages à l'ADN (Downs *et al.*, 2000 ; Rogakou *et al.*, 1999). Plusieurs kinases et phosphatases régulent l'état de phosphorylations des histones comme la kinase Ipl1/aurora et la phosphatase Glc7/PP1 (Hsu *et al.*, 2000).

Les histones peuvent aussi être ubiquitinylées ; un processus dans lequel un peptide de 76 acides aminés est ajouté aux résidus lysines. L'ubiquitination est la modification la plus

récemment liée à la réparation de l'ADN. Les signaux de réparation de l'ADN induite par les UV induisent l'ubiquitination de H3 et H4 par le complexe CUL4-DDB-Roc1 (Wang *et al.*, 2006). D'autres histones sont également ubiquitynilées suite à l'induction des signaux de réparation de l'ADN comme la monoubiquitination d'H2A, impliquée dans la réparation de l'ADN induite par les UV (Bergink *et al.*, 2006).

La proline isomérase, FPR4, a été identifiée chez la levure pour isomériser les prolines de l'extrémité N-terminale d'H3 (Nelson *et al.*, 2006). PR4 isomériser la proline 38 d'H3 ce qui régule le niveau de méthylation de la lysine 36 d'H3.

La déimination des histones implique la conversion d'une arginine en citrulline. Les arginines d'H3 et d'H4 peuvent être converties en citrullines par l'enzyme PADI4 (Cuthbert *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004). La fonction précise de ce processus reste toujours inconnue.

3) Les variants d'histones

La famille des histones regroupe différents types de protéines. Les histones canoniques (H2A, H2B.1/H2B.2, H3.1/H3.2, H4) sont les composants universels des nucléosomes. Ces histones sont synthétisées en phase S et incorporées dans la chromatine principalement lors de la réplication.

Des isoformes non-alléliques des histones conventionnelles H2A, H2B et H3 sont nommés variants d'histones, lesquels ont généralement une expression spécifique, une localisation spécifique et un profil de distribution entre espèces propres (Boulard *et al.*, 2007 ; Malik et Henikoff, 2003).

L'étude des variants d'histones a récemment été dotée d'un grand intérêt suite à la découverte de leur rôle dans la modulation de la structure de la chromatine et sa dynamique. Leur incorporation au sein des nucléosomes nécessite l'action de remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants et/ou de protéines chaperonnes. L'intégration de ces variants d'histones dans les nucléosomes confère une nouvelle structure et de nouvelles propriétés fonctionnelles aux nucléosomes.

L'incorporation de variants d'histones au sein d'un locus précis permet la mise en place de domaines chromatinien spécifiques participant à la régulation de processus tels que la transcription, la réparation ou la formation de l'hétérochromatine (Ausió et Abbott, 2002 ;

Campos et Reinberg, 2009 ; Kamakaka et Biggins, 2005 ; Sarma et Reinberg, 2005 ; Smith, 2002).

La séquence des variants d'histones diffère de celle des histones conventionnelles au niveau de leur extrémité N-terminale, du domaine « histone-fold » ou seulement sur quelques acides aminés. Les gènes codant les variants d'histones n'ont pas le même profil d'expression que les histones canoniques, ni le même nombre de gènes, ni le même type d'ARNm synthétisé. Exprimés généralement depuis une seule copie de gène tout au long du cycle cellulaire, l'ARNm des variants d'histones, contrairement aux histones conventionnelles, est polyadénylé et la longue queue poly-A conduit à une haute stabilité de l'ARN transcrit (Moss *et al.*, 1989).

Ces variants ne sont pas toujours conservés au cours de l'évolution. Par exemple, chez l'homme, il existe plusieurs variants de l'histone H2A (H2AZ, H2AX, macroH2A et H2A.Bbd), un variant de l'histone H2B, spécifique des tissus testiculaires et des spermatozoïdes (TSH2B) et deux variants de l'histone H3 (H3.3 et CENPA). Chez *saccharomyces cerevisiae*, il existe un seul variant pour H2A (Htz1, homologue de H2AZ). De plus, il n'existe pas d'histones H3.1/H3.2 qui sont remplacées par l'histone H3.3. Le variant d'histone Cse4 (homologue de CENPA) est aussi présent dans cet organisme. Enfin, chez la drosophile, il existe un seul variant d'histone pour H2A (H2Av) et deux variants pour l'histone H3 (H3.3, Cid, homologue de CENPA).

4) Les complexes de remodelage de la chromatine

L'ADN interphasique est condensé près de mille fois. L'accessibilité à l'ADN est donc fortement compromise suite à cette compaction. Ainsi, toutes transactions de l'ADN telles que la transcription, la réplication, la réparation et la recombinaison, impliquent qu'il y ait une balance dynamique entre l'empaquetage du génome et l'accès au génome. Cette dynamique est permise, au moins en partie, par une coopération de facteurs impliqués dans le dépôt et l'enlèvement d'histones, des enzymes de modification des histones et un jeu de complexes de remodelage de la chromatine (Khorasanizadeh, 2004).

Les complexes de remodelage de la chromatine utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour modifier l'état d'empaquetage de la chromatine par déplacement, éjection de nucléosomes ou par l'échange d'histones canoniques par un de leurs variants permettant la

spécialisation de régions de chromatine (pour revue Clapier et Cairns, 2009). Par exemple H2A.Z, variant de l'histone H2A, est retrouvé sur les nucléosomes flanquant le site d'initiation de la transcription (pour revue Marques *et al.*, 2010).

Tous les complexes de remodelage de la chromatine sont conservés de la levure à l'homme avec quelques variations dans le détail de leur composition en protéines (pour revue Clapier et Cairns, 2009). La sous-unité catalytique de chaque complexe de remodelage de la chromatine est une ATPase de la famille Swi2/Snf2 dont la particularité est d'avoir un domaine ATPase séparé en deux parties (Flaus *et al.*, 2006). En complément de ce domaine ATPase, ces sous-unités catalytiques possèdent des domaines spécifiques permettant de les classer en 4 familles distinctes plus ou moins spécialisées (Flaus *et al.*, 2006). La famille SWI/SNF (« SWitching defective/Sucrose Non Fermenting ») dont la spécialité est le déplacement de nucléosomes et l'éjection de nucléosomes (pour revue Euskirchen *et al.*, 2012). La famille ISWI (« Imitation SWitch ») est impliquée dans le contrôle de l'espacement entre les nucléosomes favorisant l'assemblage de la chromatine, la répression de la transcription ou encore assistant l'activation de l'ARN polymérase II (pour revue Erdel et Rippe, 2011). Les complexes de remodelage de la famille CHD (« Chromodomaine, Helicase, DNA binding ») se sont spécialisés dans la régulation de la transcription (pour revue Marfella et Imbalzano, 2007). Quant à la famille INO80 (« INOsitol requiring 80 »), elle possède diverses fonctions comme le déplacement de nucléosomes, l'éviction de nucléosomes, l'échange d'histones et ce dans plusieurs processus comme la régulation de la transcription ou la réparation de l'ADN (pour revue Bao et Shen, 2007 ; Clapier et Cairns, 2009). Comme nous le verrons par la suite, toutes les activités des complexes de la famille INO80 sont en relation étroite avec les variants de l'histone H2A : H2AX et H2A.Z.

Les protéines Pontin et Reptin font parties d'un cœur protéique commun à tous les complexes de la famille INO80 (**Tableau 1**). Ainsi, la suite de cette partie sera principalement dédiée aux complexes de remodelage de la chromatine qui constituent cette famille soit les complexes INO80, SRCAP (SWR1 chez la levure) et TIP60 qui ont été caractérisés chez l'homme, la levure et la drosophile (Cai *et al.*, 2003 ; Cai *et al.*, 2005 ; Cai *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2011 ; Fuchs *et al.*, 2001 ; Ikura *et al.*, 2000 ; Jin *et al.*, 2005 ; Jónsson *et al.*, 2001 ; Jónsson *et al.*, 2004 ; Klymenko *et al.*, 2006 ; Kobor *et al.*, 2004 ; Krogan *et al.*, 2003 ; Kusch *et al.*, 2004 ; Mizuguchi *et al.*, 2004 ; Shen *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2003 ; Yao *et al.*, 2008).

Espèce	Levure		Drosophile		Homme		
Complexes	INO80	SWR1	INO80	TIP60	INO80	SRCAP	TIP60
Sous-unités homologues	yIno80	Swr1	dIno80	Domino	hIno80	Srcap	p400
	yPontin et yReptin		dPontin et dReptin		hPontin et hReptin		
	Arp5, 8	Arp6	dArp5, 8	BAP55	Arp5, 8	Arp6	Actin
	Arp4, Actin1		dActin1	Actin87E	BAF53a		
	Taf14	Yaf9		dGAS41		GAS41	
	Ies2, 6				hIes2, 6		
		Swc4/Eaf2		dDMAP1		DMAP1	
		Swc2/Vps72		dYL-1		YL-1	
		Bdf1		dBrd8			Brd8/TRC /p120
		H2A.Z, H2B		H2A _v , H2B		H2A.Z, H2B	
		Swc6/Vps71				Znf-HIT1	
				dTra1			TRRAP
				dTip60			Tip60
				dMRG15			MRG15, MRGX
				dEaf6			FLJ11730
				dMRGBP			MRGBP
				E(Pc)			EPC1, EPC-like
				dING3			ING3
Sous-unités uniques	Ies1, 3-5, Nhp10	Swc3, 5, 7	Pho		YY1, Amida, NFRKB, MCRS1, UCH37, FLJ90652, FLJ20309		

Tableau 1. Composition des complexes de remodelage de la chromatine de la famille INO80 et présentation des orthologues.

L'importance des protéines Pontin et Reptin aux seins de ces complexes n'a été décrite que dans la régulation transcriptionnelle et la réparation des cassures double brin d'ADN. Je me suis donc focalisé sur le rôle que joue cette famille de complexes dans ces processus cellulaires. Comme nous le verrons, les protéines Pontin et Reptin sont essentielles à l'assemblage fonctionnel de ces complexes, je me suis donc particulièrement attaché à détailler le rôle de ces trois complexes dans ces processus.

B) Le complexe INO80

Initialement identifié dans un crible étudiant les facteurs régulateurs de la biosynthèse des phospholipides chez la levure (Ebbert *et al.*, 1999), le complexe INO80 comporte une quinzaine de sous-unités dont les protéines Pontin et Reptin (Shen *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2011). *In vitro*, il possède les activités ATPase, hélicase 3' vers 5' et il est capable de fixer des structures d'ADN spécialisées ressemblant aux jonctions de Holliday ou aux fourches de réplication. Toujours *in vitro*, il possède une activité de déplacement de nucléosome ATP-dépendante et d'échange du variant d'histone Htz1 (H2A.Z chez l'homme) par l'histone H2A (Jin *et al.*, 2005 ; Jónsson *et al.*, 2001 ; Jónsson *et al.*, 2004 ; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011 ; Shen *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2003 ; Udugama *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2007). Notons que son activité de remodelage de nucléosomes requiert la présence d'ADN extra-nucléosomal d'une taille supérieure ou égale à 30 paires de base (Udugama *et al.*, 2011).

Par son activité de remodelage de la chromatine le complexe INO80 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle, la progression des fourches de réplication, la réparation de l'ADN (pour revue Conaway et Conaway, 2009), et la régulation de la structure des télomères (Yu *et al.*, 2007).

Les protéines yPontin et yReptin sont essentielles à l'assemblage fonctionnel du complexe INO80 (Jónsson *et al.*, 2004). Dans une souche déplétée de la protéine yReptin, en utilisant un système degron sensible à la température, le complexe INO80 purifié est dépourvu de yPontin et de la sous-unité yArp5 (Jónsson *et al.*, 2004). La sous-unité yArp5 est essentielle aux fonctions du complexe INO80 (Shen *et al.*, 2003). En conséquence, le complexe INO80, sans Arp5 ni les protéines Pontin et Reptin, n'est plus capable de remodeler un substrat chromatinien *in vitro* (Jónsson *et al.*, 2004).

1) Le complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin (CDB)

Les cassures double brin (CDB) sont des lésions particulièrement toxiques pour la cellule. Les CDB endogènes, générées suite à l'arrêt ou l'effondrement des fourches de réplication lorsqu'elles rencontrent une lésion d'ADN simple brin telle qu'un site abasique ou une cassure simple brin, sont relativement fréquentes. Elles ont été estimées à près de 50 CDB par cycle cellulaire pour les cellules humaines et environ 1 pour 4 à 5 cellules par cycle cellulaire pour *Saccharomyces cerevisiae* (Vilenchik et Knudson, 2003). Les CDB peuvent aussi être formées par l'exposition à des agents génotoxiques tels que les radiations ionisantes (IR). L'efficacité de la réparation des CDB est essentielle pour maintenir la stabilité du génome car, mal réparées, elles peuvent aboutir à des délétions, insertions, réarrangements chromosomiques ou même à des translocations ; phénomènes souvent associés aux processus de cancérisation et de vieillissement.

a) Vue d'ensemble de la réparation des CDB

Les cassures double brin d'ADN sont principalement réparées par suture non homologue (NHEJ pour « Non-Homologous End Joining ») ou par recombinaison homologue (RH). Le NHEJ fusionne les extrémités d'ADN cassées et dans certains cas cela requiert un traitement de l'ADN avant que la ligature s'effectue. Ceci pouvant conduire à la perte d'information génétique.

Le NHEJ est le mécanisme de réparation majoritaire des cassures. Cette voie de réparation est initiée par la fixation de l'hétéro-dimère Ku70/Ku80 aux extrémités d'ADN cassées. Ku70/Ku80 va orchestrer l'activité des autres protéines de la réparation et recrute la kinase DNA-PKcs (pour « DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit). DNA-PKcs phosphoryle et active des protéines additionnelles de la réparation, l'incluant elle et la nucléase Artemis/Dclre1c. Artemis et/ou le complexe hétéro-trimérique Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN, Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) chez la levure) permettent le traitement des extrémités d'ADN avant leur ligature. Les extrémités d'ADN sont jointes par l'activité de polymérases et d'un complexe ligase contenant les protéines Xrcc4, Xlf et Lig4 (**Figure 3A**). Le NHEJ est un mécanisme de réparation fidèle même si l'action conjointe des enzymes de traitement des extrémités peut parfois aboutir à l'apparition de mutations et/ou délétions.

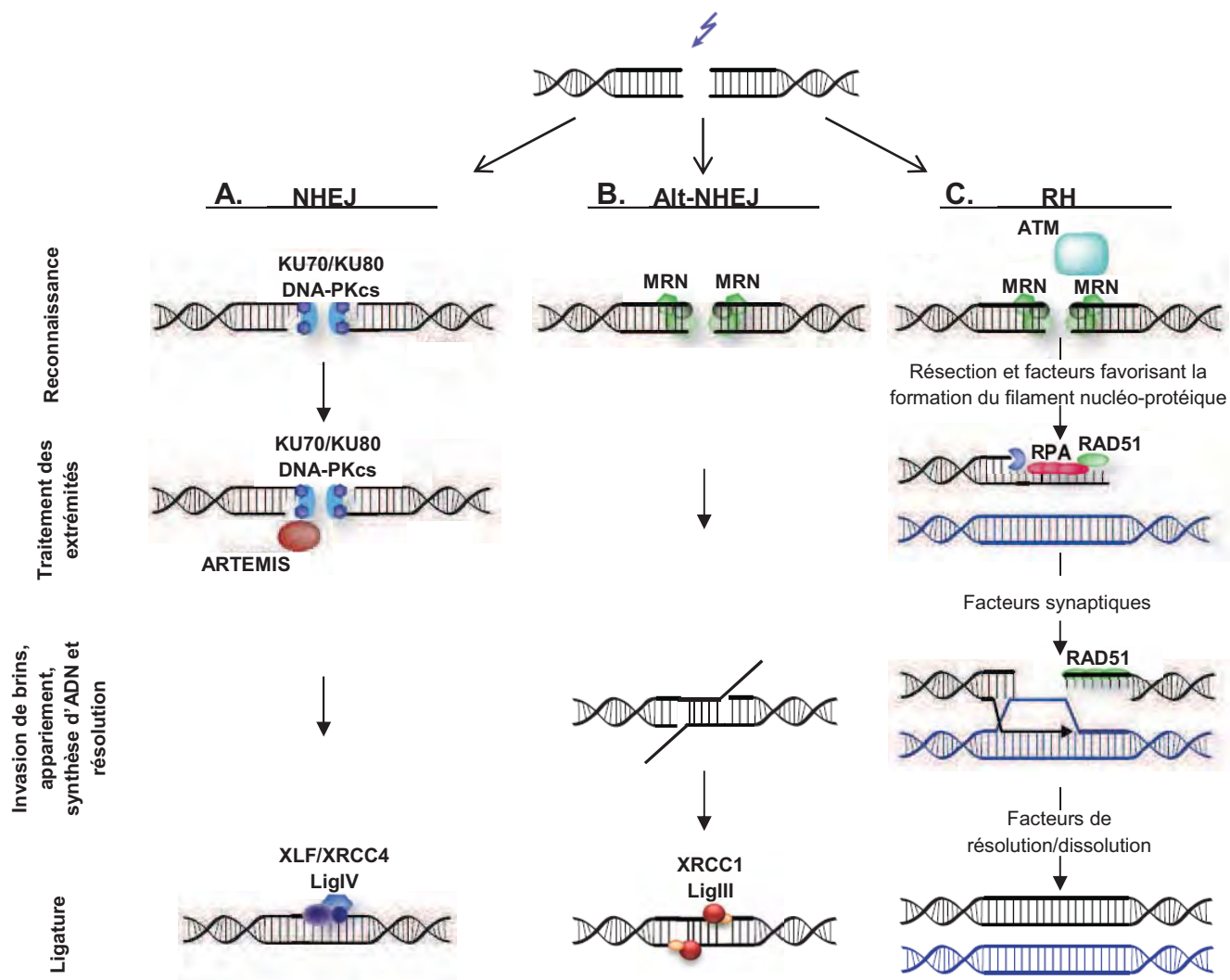


Figure 3. Réparation des cassures double brin (CDB). Les cassures double brin d'ADN sont principalement réparées par suture non homologue (NHEJ pour « Non-Homologous End Joining ») ou par recombinaison homologue (RH). **A.** Réparation par NHEJ canonique (le plus courant), les extrémités d'ADN cassées sont fixées par l'hétéro-dimère Ku70/Ku80, lequel va orchestrer l'activité des autres protéines de la réparation et recrute la kinase DNA-PKcs. DNA-PKcs phosphoryle et active des protéines de la réparation additionnelle dont la nucléase Artemis. Artemis permet le traitement des extrémités d'ADN avant leur ligature. Les extrémités d'ADN sont jointes par l'activité de polymérases et d'un complexe ligase contenant les protéines Xrcc4, Xlf et LigIV. **B.** Les CDB peuvent aussi être réparées par le Alt-NHEJ qui est un mécanisme minoritaire. La détection du dommage est réalisée par le complexe MRN. Mre11 induit alors une résection des extrémités de la cassure qui est suivie par la ligature des extrémités grâce au complexe ligase III/XRCC1. Le Alt-NHEJ est un mécanisme très infidèle contrairement au NHEJ canonique. **C.** Contrairement au NHEJ, la réparation par RH est une voie de réparation dite sans erreur. Elle utilise une chromatide sœur, présente seulement en phase S ou G2 du cycle cellulaire, comme patron pour réparer les cassures double brin. La RH est initiée par la résection des extrémités d'ADN, impliquant le complexe MRN et plusieurs autres facteurs dont des nucléases. MRN recrute également la kinase ATM, qui phosphoryle l'histone H2AX et plusieurs autres protéines impliquées dans le RH et les voies de signalisation des points de contrôle du cycle cellulaire. Les ADN simple brin générés par la résection des extrémités d'ADN sont fixés par RPA, laquelle est subséquemment remplacée par RAD51. RAD51 permet l'invasion de l'ADN simple brin dans un patron d'ADN double brin homologue, conduisant à la formation d'une synapse, à la synthèse d'un nouvel ADN et à la résolution de la jonction. Beaucoup d'autres protéines sont impliquées dans la réparation par NHEJ ou RH que je ne présente pas ici par soucis de clarté. Pour le détail, voir les revues récentes : Filippo *et al.* (2008) et Lieber (2010).

Il existe un mécanisme alternatif au NHEJ (Alt-NHEJ). Le NHEJ alternatif opère en absence des facteurs classiques du NHEJ comme Ku, DNA-PKcs ou XRCC4. Ce mécanisme n'a pu être observé que lorsque le NHEJ canonique est déficient. Il se caractérise par la détection du dommage par le complexe MRN. Mre11 induit alors une résection sur une courte distance des extrémités de la cassure suivie par la ligature des extrémités grâce au complexe Ligase III/XRCC1. L'étape de ligature est généralement associée à de la recherche de micro-homologies aux alentours de la cassure accentuant la nécessité de réséquer les extrémités de la cassure (**Figure 3B**). Ainsi, le Alt-NHEJ est toujours associé à l'apparition d'erreurs chromosomiques après la réparation.

Contrairement au NHEJ, la réparation par RH est une voie de réparation dite sans erreur. Elle utilise une chromatide sœur, accessible seulement en phase S ou G2 du cycle cellulaire, comme patron pour réparer les cassures double brin. La RH est initiée par la résection des extrémités d'ADN, impliquant le complexe MRN et plusieurs autres facteurs dont des nucléases. MRN recrute également la kinase ATM, qui phosphoryle l'histone H2AX et plusieurs autres protéines impliquées dans la RH et les voies de signalisation des points de contrôle du cycle cellulaire. Les ADN simple brin générés par la résection des extrémités d'ADN sont fixés par RPA, laquelle est subséquentement remplacée par RAD51. RAD51 permet l'invasion de l'ADN simple brin dans un patron d'ADN double brin homologue, conduisant à la formation d'une synapse, à la synthèse d'un nouvel ADN et à la résolution de la jonction (**Figure 3C**). Beaucoup d'autres protéines sont impliquées dans la réparation par NHEJ ou RH que je ne présente pas ici par souci de clarté. Des descriptions plus détaillées de ces mécanismes de réparation ont récemment été rassemblées dans les revues de Filippo *et al.* (2008) et Lieber (2010).

b) Le complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin chez la Levure

Chez la levure, le rôle des complexes de remodelage de la chromatine dans la réparation des CDB a été principalement étudié par l'utilisation du système HO (Haber, 2000). Ce système est basé sur le mécanisme de changement de sexe de la levure bourgeonnante (« mating-type switching »). Comme beaucoup d'eucaryotes, la levure est capable d'effectuer la reproduction sexuée. Son cycle est un cycle haplodiplobiontique classique et la levure exhibe une alternance de phases haploïdes et diploïdes, ponctuées par des conjugaisons et des méioses. La conjugaison se produit lorsque deux cellules de types

sexuels différents (mata ou mata α) se rencontrent et fusionnent pour donner une cellule diploïde. Le mécanisme de contrôle du type sexuel est porté par le chromosome III. Ce chromosome contient trois copies de la région codant pour le type sexuel : le locus *MAT* qui est transcriptionnellement actif et peut être de type a ou α ; le locus *HML* (Hidden Mat Left) de type α et transcriptionnellement inactif ; le locus *HMR* (Hidden Mat Right) de type a et transcriptionnellement inactif. Le passage d'un type sexuel à l'autre nécessite l'expression de l'endonuclease HO. HO clive en un site le locus *MAT*. Cette CDB conduit à une recombinaison intra-chromosomique avec l'une des deux cassettes donneuses, *HML* α si *MAT* est de type a ou *HMR*a si *MAT* est de type α (**Figure 4**). Dans le système HO utilisé pour étudier la réparation des CDB, les cassettes donneuses ont été supprimées et le gène codant HO est sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ainsi, l'induction de HO entraîne une seule CDB persistante localisée spécifiquement sur le locus *MAT*. Notons que cette CDB au locus *MAT*, en cellule haploïde, sans séquence homologue au locus *MAT*, ne peut être réparée que par NHEJ. Par contre, les protéines de la réparation par RH sont toujours recrutées à la CDB.

L'implication du complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin a été démontrée pour la première fois chez la levure. Des souches dépourvues de la protéine yIno80 ou des sous-unités essentielles aux activités enzymatiques du complexes INO80, yArp5 ou yArp8, sont hypersensibles aux agents induisant des dommages à l'ADN (Morrison *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2004). Comme le complexe INO80 est également connu pour réguler la transcription de nombreux gènes (voir ci-dessous), Morrison *et al.* (2004) ont vérifié que l'expression des protéines de la réparation des CDB n'était pas affectée par la délétion de ces sous-unités (Morrison *et al.*, 2004).

En plus d'être génétiquement lié au processus de réparation de la chromatine, plusieurs études utilisant le système HO démontrent que le complexe INO80 est directement recruté à la CDB (Downs *et al.*, 2004 ; Morrison *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2007). Des expériences d'immuno-précipitation de chromatine (ChIP) au locus *MAT* révèlent que les sous-unités spécifiques du complexe INO80, yIno80, yArp5 et yArp8 sont enrichies autour d'une CDB avec une même cinétique (Downs *et al.*, 2004 ; Morrison *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2007). Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que le complexe INO80 a un rôle direct dans la réparation des cassures double brin.

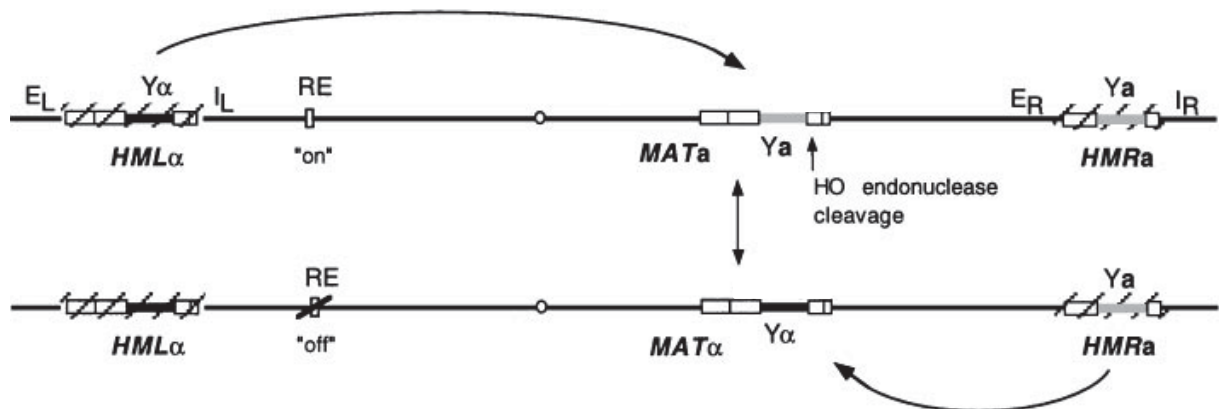


Figure 4. Les *loci* « Mating-type » sur le chromosome III de *Saccharomyces cerevisiae*. En plus du locus *MAT* exprimé, le chromosome III contient deux *loci* donneurs non exprimés, *HML* et *HMR*. Ces donneurs sont maintenus dans une structure hétérochromatique (lignes en diagonales) induite par deux séquences de mise en silence *HML-E* (*E_L*) et *HML-I* (*I_L*), et *HMR-E* (*E_R*) et *HMR-I* (*I_R*). Quand l'endonucléase *HO* est exprimée, les allèles *MAT* peuvent être commutés par conversion de gènes, dans un mécanisme de recombinaison homologue. Le choix du site donneur est contrôlé par le « Recombination Enhancer » (*RE*). Dans des cellules *MAT_a*, *RE* est activé faisant de *HML* le site donneur préférentiel. Dans des cellules *MAT_α*, le *RE* est éteint faisant de *HMR* le site donneur préférentiel.

D'après Haber (1998) *Annu. Rev. Genet.*, **32**:561–599.

- *Facteurs affectant le recrutement d'INO80 aux CDB*

Un des premiers évènements qui peut être détecté suite à l'induction d'une CDB est la phosphorylation de l'histone H2A sur la sérine 129 (Downs *et al.*, 2000) (chez l'homme cette phosphorylation est portée par le variant d'histone H2AX). Cette phosphorylation constitue un signal épigénétique (nommé γ -H2AX quelque soit l'espèce étudiée) reconnu par de nombreuses protéines de la réparation (Yuan *et al.*, 2010). Des études réalisées chez la levure montrent que le recrutement du complexe INO80 est dépendant de la phosphorylation de l'histone H2A suite à une CDB (Downs *et al.*, 2004 ; Morrison *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2004).

La purification du complexe INO80 à partir de cellules traitées au MMS (pour Méthyl Methane Sulfonate, agent alkylant qui provoque des cassures simple et double brin par le blocage des fourches de réplication) co-immunoprécipite l'histone γ -H2AX (Morrison *et al.*, 2004), démontrant que le complexe INO80 interagit physiquement avec γ -H2AX. Cette interaction est dépendante de la sous-unité yNhp10 (sous-unité non essentielle aux activités enzymatiques du complexe INO80). Par ailleurs, la déplétion de yNhp10 conduit également à la perte de la sous-unité yIes3 et surtout ne permet plus le recrutement de INO80 au site de CDB *in vivo* (Morrison *et al.*, 2004). Ces résultats démontrent que le recrutement du complexe INO80 aux CDB est dépendant d'une interaction entre ces sous-unités yNhp10/yIes3 et γ -H2AX.

Il est possible que d'autres sous-unités permettent, si ce n'est le recrutement, au moins la stabilisation du complexe INO80 à la CDB. Par exemple, la sous-unité yArp4, bien que non essentielle au recrutement de INO80 (Morrison *et al.*, 2004), est connue pour interagir physiquement avec γ -H2AX (Downs *et al.*, 2004). Un autre exemple concerne la sous-unité yHMO2. Récemment, Ray et Grove ont démontré que yHMO2 présente une affinité préférentielle pour les extrémités franches ou cohésives d'ADN (Ray et Grove, 2009). yHMO2 pourrait donc être impliquée dans le recrutement de INO80 aux extrémités d'ADN générées par les cassures. En accord avec cette hypothèse, INO80 est de plus en plus enrichi lorsque l'on se rapproche du site de cassure généré par l'endonucléase HO au locus *MAT* chez la levure (van Attikum *et al.*, 2007), suggérant que le complexe INO80 doit pouvoir être recruté directement sur les extrémités d'ADN générées par la CDB.

- *L'activité de remodelage de la chromatine du complexe INO80 aux CDB*

Chez les eucaryotes, la réparation des CDB doit s'effectuer dans le contexte de la chromatine où l'accès à l'ADN est fortement limité par la barrière que représentent les nucléosomes. Afin de réparer efficacement les dommages de l'ADN, le remodelage de la chromatine est nécessaire pour permettre aux protéines de la réparation d'accéder à la lésion. Par son activité de remodelage de la chromatine, le complexe INO80 permettrait l'éviction de nucléosome en périphérie d'une lésion (Tsukuda *et al.*, 2005 ; van Attikum *et al.*, 2007).

Après induction d'une CDB au locus *MAT*, deux groupes observent une diminution des signaux de ChIP obtenus pour les histones H3, H2B ou encore γ -H2AX comparés aux signaux obtenus avant induction de la cassure (Tsukuda *et al.*, 2005 ; van Attikum *et al.*, 2007). Cette diminution de la quantité d'histones présentes à proximité de la cassure reflète un processus d'éviction de nucléosomes. Or, la délétion des gènes codants pour les sous-unités yArp8 (sous-unité nécessaire aux activités enzymatiques d'INO80) ou yNhp10 (sous-unité nécessaire pour le recrutement d'INO80 à la CDB) conduit à la persistance des histones autour des sites lésés (Tsukuda *et al.*, 2005 ; van Attikum *et al.*, 2007), démontrant que l'activité du complexe INO80 ou son recrutement à la CDB sont importants pour le retrait des nucléosomes autour des CDB.

Outre l'éviction de nucléosome, le complexes INO80 agit de manière coordonnée avec le complexe SWR1 pour réguler le niveau de γ -H2AX aux sites de cassures double brin (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006). Peu après la formation d'une CDB, le complexe SWR1 dépose l'histone Htz1 (H2A.Z chez l'homme) au niveau de la cassure (Kalocsay *et al.*, 2009). Papamichos-Chronakis *et al.* observent que la délétion de la protéine yIno80 conduit à un niveau de γ -H2AX réduit corrélé à une incorporation aberrante de l'histone Htz1 (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006). Sachant qu'INO80 est le seul complexe connu pour remplacer l'histone Htz1 par l'histone canonique H2A (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011), ces résultats suggèrent qu'INO80 a un rôle indirect dans la phosphorylation de l'histone H2A en empêchant l'incorporation anarchique de Htz1 par SWR1. Ainsi, sans INO80, il suffirait de bloquer l'incorporation de Htz1 pour permettre la phosphorylation adaptée de H2A. Comme attendu, ils montrent que, dans une souche privée des protéines yIno80 et ySwr1 ou yIno80 et Htz1, le niveau de γ -H2AX aux sites de CDB est restauré (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006).

- *INO80 et la résection d'ADN*

Comme nous l'avons vu précédemment, la réparation par RH mais également la réparation par Alt-NHEJ est initiée par la résection de l'ADN effectuée par le complexe hétéro-trimérique Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX, MRN chez l'homme) et des exo-nucléases. Le chargement de ces protéines de la réparation est facilité par le complexe INO80, probablement par son activité de remodelage de nucléosomes à proximité d'une CDB.

Le groupe de Susan Gasser utilise une technique basée sur la quantification d'ADN simple brin par PCR pour évaluer l'efficacité de la résection *in vivo* lorsque le complexe INO80 est fonctionnellement altéré (INO80 Δ Arp8) ou bien lorsque le complexe INO80 n'est plus recruté aux CDB (INO80 Δ Nhp10) (van Attikum *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2007). Ils observent alors que INO80 Δ Arp8 ou INO80 Δ Nhp10 ralentit grandement l'apparition d'ADN simple brin au site de coupure (van Attikum *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2007). Un effet similaire sur la formation d'ADN simple brin a également été observé par Southern Blot et par des tests d'accessibilité aux enzymes de restriction dans des souches délétées pour les gènes *ARP8*, *NHP10* et *INO80* (Morrison *et al.*, 2007). En accord avec ce résultat, la délétion de *ARP8* diminue près de trois fois le recrutement de la protéine Mre11 (sous-unité du complexe MRX, MRN chez l'homme) à proximité d'une cassure (van Attikum *et al.*, 2007). Ainsi, l'éviction de nucléosomes par le complexe INO80 permettrait de rendre accessible au complexe MRX les extrémités d'ADN générées par une cassure permettant de ce fait la résection de l'ADN.

Notons que ces défauts de résection à proximité d'une CDB ne sont pas toujours détectables suivant la souche utilisée ou suivant l'expérience permettant de les mesurer. En effet, aucun problème de résection n'a été observé par des expériences d'accessibilité aux enzymes de restriction dans une souche dépourvue de *yArp8* ou dans une souche dont les 900 premières pb de *INO80* ont été supprimées (Chen, Carson *et al.*, 2008 ; Tsukuda *et al.*, 2005). Cependant, INO80 n'est pas le seul complexe de remodelage de la chromatine qui permet l'éviction de nucléosomes et donc la résection d'ADN consécutive au chargement des protéines de la réparation. Les complexes RSC (PBAF chez l'homme) et Fun30 (SMARCA1 chez l'homme) sont également impliqués dans le remodelage chromatinien nécessaire à la résection (Chen, Cui *et al.*, 2012 ; Costelloe *et al.*, 2012 ; Durand-Dubief *et al.*, 2012 ; Kent *et al.*, 2007 ; Liang *et al.*, 2007 ; Shim *et al.*, 2007). Il est donc tout à fait

envisageable qu'il y ait une redondance d'activité entre ces trois complexes pour le traitement chromatinien en périphérie d'une cassure. Suivant la souche étudiée ou suivant le contexte chromatinien dans lequel la CDB est générée, certains complexes doivent être plus ou moins efficacement impliqués. Appuyant cette idée, l'enrichissement d'INO80 autour d'une CDB n'est pas équivalent suivant le locus où est générée la cassure. Alors qu'au locus *MAT*, INO80 est de plus en plus enrichie lorsque l'on se rapproche de la cassure, son enrichissement est homogène sur les cinq premières kilobases entourant une cassure générée sur un autre locus (le locus *PRD10*) (van Attikum *et al.*, 2007). Ainsi, l'activité d'INO80 en périphérie d'une CDB doit dépendre du contexte dans lequel la cassure apparaît.

- *Implication du complexe INO80 dans la réparation par NHEJ et dans la réparation par RH*

Compte tenu de son recrutement et de son activité à la CDB, il n'est pas étonnant que le complexe INO80 soit impliqué dans les deux mécanismes de réparation des CDB, la RH (Kawashima *et al.*, 2007 ; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; Tsukuda *et al.*, 2005 ; Tsukuda *et al.*, 2009 ; van Attikum *et al.*, 2007), et le NHEJ (Morrison *et al.*, 2004 ; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; Tsukuda *et al.*, 2005 ; van Attikum *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2007). Par contre, dans les deux cas, l'étape précise pendant laquelle le complexe INO80 intervient reste obscure.

- Rôle du complexe INO80 dans la réparation par NHEJ :

Le rôle du complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin semble affecter spécifiquement le mécanisme Alt-NHEJ mais pas le NHEJ classique. Rappelons que dans le système HO, la CDB générée au locus *MAT* ne peut être réparée que par NHEJ suite à la délétion des *loci* donneurs *HML* et *HMR*. Ainsi, après une courte expression de l'endo-nucléase HO, la survie des levures est principalement due au mécanisme classique de réparation par NHEJ. Dans ce test, la survie de souches privées des 900 premières pb de *INO80*, ou de *ARP8* ou de *NHP10* n'est pas affectée comparé aux souches sauvages (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; Tsukuda *et al.*, 2005 ; van Attikum *et al.*, 2007), indiquant que la voie de réparation par le NHEJ classique n'est pas affectée par le complexe INO80.

Par contre, en présence d'une expression constante de HO, la survie des cellules est dépendante de la réparation par Alt-NHEJ, puisqu'une mutation dans le site HO doit survenir pour éviter un nouveau clivage. Dans ce test, les souches dépourvues de *yArp5*, *yArp8* ou des 900 premières pb de *INO80* ont une survie compromise, indiquant un défaut dans le Alt-NHEJ (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; Tsukuda *et al.*, 2005 ; van Attikum *et al.*, 2007). Ces résultats peuvent être assimilés aux retards de traitement des extrémités d'ADN observés pour les mutants du complexe INO80. INO80 doit être impliqué dans la résection d'ADN courte distance nécessaire au Alt-NHEJ pour la recherche de micro-homologies.

- Rôle du complexe INO80 dans la RH :

Etant donné que le complexe INO80 facilite le chargement des protéines nécessaires à la résection d'ADN, il semble possible qu'il participe à la réparation par RH. Pour initier la RH, l'ADN simple brin généré par la résection est dans un premier temps recouvert par la protéine RPA, laquelle est ensuite remplacée par Rad51 qui, avec Rad52, permet l'invasion de l'ADN simple brin sur une séquence homologue double brin.

Etrangement, le chargement de RPA sur le locus *MAT* n'est pas ralenti après induction de la cassure dans des souches dépourvues de *yArp8* et des loci *HMR* et *HML* comparé aux souches sauvages (Tsukuda *et al.*, 2005). De plus, dans des souches possédant les sites *HMR* et *HML*, donc compétentes pour procéder à la réparation de la cassure par RH, l'absence d'*ARP8* n'a pas d'effet sur le chargement de Rad51 au site de cassure (Tsukuda *et al.*, 2009). Ces résultats nous indiquent qu'INO80 ne doit pas être nécessaire pour la résection d'ADN longue distance initiant la RH.

Par contre, INO80 a un rôle dans la phase tardive de la recombinaison homologue, probablement en accompagnant l'invasion de brins au site donneur par un remodelage chromatinien sur ce locus. En effet, des levures possédant un complexe INO80 non-fonctionnel, dû à l'absence de la sous-unité Arp8, présentent une diminution significative de la quantité de Rad51 au locus donneur *HMR* après induction de HO comparé aux levures sauvages (Tsukuda *et al.*, 2009). Ce résultat est corrélé au fait que cette souche délétée pour *yArp8* ainsi qu'une souche dont les 900 premières pb d'*INO80* ont été supprimées présentent un retard pour l'invasion de brins au locus *HMR* (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; Tsukuda *et al.*, 2009). L'impact d'INO80 sur le remodelage chromatinien au locus donneur

est observé par Tsukuda *et al.* (2009). Ils suivent, par ChIP dirigée contre l'histone H2B, la position des nucléosomes au site donneur pendant la réparation par RH. Ainsi, ils montrent que dans une souche sauvage, les nucléosomes se déplacent au site donneur dans une cinétique cohérente avec l'invasion de brins, alors que le déplacement de nucléosomes n'est plus observé dans une souche dépourvue d'yArp8 (Tsukuda *et al.*, 2009).

La recombinaison observée au locus *MAT* impliquant les *loci HML* et *HMR* est un cas particulier de RH intra-chromosomique mais INO80 a également été impliqué dans la recombinaison spontanée entre chromatides sœurs ou entre allèles présents sur différents chromosomes (Kawashima *et al.*, 2007). Une souche dans laquelle la sous-unité yArp8 a été supprimée présente peu à peu de différence dans la fréquence de recombinaison spontanée comparé à une souche sauvage. Par contre, quand la fréquence de recombinaison augmente dans une souche sauvage traitée au MMS, elle reste inchangée dans une souche dépourvue de yArp8 (Kawashima *et al.*, 2007), démontrant que l'activité catalytique d'INO80 est importante pour la RH induite par le MMS. Le rôle du complexe INO80 dans la RH induite par le MMS a été récemment confirmé par Falbo *et al.* (2009). Le MMS induit des cassures double brin suite au blocage des fourches de réplication sur les bases modifiées (Nikolova *et al.*, 2010). Falbo *et al.* montrent qu'INO80 est recruté sur les origines de réplication chez *S. cerevisiae*. La présence d'INO80 sur ces sites est nécessaire, entre autre, au recrutement de Rad51 suite au blocage des fourches de réplication induite par le MMS (Falbo *et al.* 2009). Rad51 permet alors la RH aux sites de réplication avortés, essentielle pour la reprise de la réplication.

En conclusion, INO80 semble être impliqué dans la résection d'ADN à courte distance nécessaire pour l'Alt-NHEJ probablement en collaborant avec les complexes RSC et Fun30. D'ailleurs, RSC et INO80 ont été trouvés comme interagissant génétiquement dans un criblage s'intéressant au rôle de l'acétylation de RSC dans la réparation des dommages à l'ADN (Charles *et al.*, 2011). Par contre, comme mentionné précédemment le rôle d'INO80 dans la résection longue distance est discutable. Même si dans les études mentionnées dans cette section aucun effet sur la résection longue distance n'a pu être observé, un retard dans l'apparition d'ADN simple brin suite à une cassure double brin a été mis en évidence par van Attikum *et al.* (2004) et van Attikum *et al.* (2007). Ainsi, le rôle du complexe INO80 dans la RH doit dépendre du fond génétique des souches étudiées, du site lésé et du type de RH engagé.

- *Le complexe INO80 participe à l'activation des points de contrôle*

Les dommages de l'ADN conduisent à l'activation de voies de signalisation, nommées points de contrôle, qui permettent de bloquer la progression du cycle cellulaire afin que la réparation puisse s'achever correctement avant que la cellule ne passe à l'étape suivante de son cycle (Finn *et al.*, 2012). Ces points de contrôle sont principalement dépendants des kinases Tel1/Mec1 (ATM/ATR chez l'homme). De nombreuses études montrent que le complexe INO80 joue un rôle dans l'activation de ces points de contrôle (Morrison *et al.*, 2007 ; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; van Attikum *et al.*, 2007).

Une de ces voies de signalisation commence par l'apparition d'ADN simple brin à la CDB. Cet ADN simple brin conduit à l'activation de la kinase Mec1 (ATR chez l'homme). Mec1 initie alors une cascade d'activation d'autres protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire tel que la kinase Rad53 (Chk2 chez l'homme). Lorsque Rad53 est activé par phosphorylation, cette dernière phosphoryle et inactive les phosphatases Cdc25A et Cdc25C. L'inactivation de ces phosphatases bloque les kinases cycline-dépendantes en aval de Cdc25A ou Cdc25C stoppant ainsi la progression du cycle cellulaire en S ou G2/M (Harrison et Haber, 2006).

Après induction de cassures double brin persistantes, non réparables par RH mais permettant la résection d'ADN, les cellules stoppent leur cycle cellulaire en G2/M à cause de l'activation de Mec1. Or, dans une souche dépourvue de la protéine yIno80, la cellule continue son cycle (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006). L'implication du complexe INO80 peut s'expliquer par son rôle dans la formation d'ADN simple brin aux extrémités d'ADN générées par la cassure. Le défaut de traitement de la chromatine par le complexe INO80 dans des souches privées des sous-unités yArp8 ou yNhp10 conduit à une diminution du recrutement de la protéine Mec1 au site de cassure qui est corrélé à une diminution de l'activation des protéines en aval de la signalisation dépendantes de Mec1 tel que Rad53 (van Attikum *et al.*, 2007).

Plus directement, le complexe INO80 semble faire partie de la cascade de signalisation d'un des points de contrôle initiée par Tel1/Mec1. L'hydroxyurée (HU) ou le MMS provoque des dommages à l'ADN en perturbant la réplication. Lorsque des levures sont traitées par HU ou MMS, les défauts dans la réplication engendrés activent une voie de signalisation médiée par les kinases Tel1/Mec1 bloquant alors le cycle cellulaire en phase S en passant par

l'activation de Rad53. Morrison et al. démontrent que la sous-unité yIes4 est phosphorylée par les kinases Mec1/Tel1 après induction de cassures double brin (Morrison *et al.*, 2007). Une mutation de yIes4 mimant une hyper-phosphorylation conduit à l'activation de Rad53 ainsi qu'au blocage des cellules en phase S (Morrison *et al.*, 2007). Ces données nous indiquent qu'INO80, par sa sous-unité yIes4, est directement impliqué dans la cascade de phosphorylation induite par Mec1/Tel1 (**Figure 5**).

c) Le complexe INO80 dans la réparation des cassures double brin chez les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, bien que le complexe INO80 ait également un rôle dans le remodelage chromatinien aux sites de cassures double brin, l'histoire n'est pas tout à fait identique à celle observée chez la levure (Gospodinov *et al.*, 2011 ; Kashiwaba *et al.*, 2010 ; Kitayama *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2007).

- **Rôle du complexe INO80 dans la RH :**

Le complexe INO80 de mammifères partage huit sous-unités communes avec le complexe de levure dont la sous-unité catalytique Ino80 et les protéines Pontin et Reptin (Chen *et al.*, 2011). En plus, le complexe INO80 humain possède sept sous-unités spécifiques des mammifères dont la sous-unité Ying Yang-1 (YY1). YY1 est un facteur de transcription à doigt de zinc appartenant au groupe Polycomb.

L'implication du complexe INO80 de mammifères dans la réparation par RH a été initiée par les études réalisées sur sa sous-unité YY1. La perte de YY1 conduit à des aberrations chromosomiques, incluant la polyploïdie. De plus, des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de YY1 sont hypersensibles aux dommages de l'ADN (Wu *et al.*, 2007). Wu *et al.* ont alors étudié l'implication du complexe INO80 dans la stabilité du génome (Wu *et al.*, 2007).

En utilisant un système dont seule la réparation par RH d'une CDB permet la réactivation d'un gène rapporteur, Wu *et al.* ont trouvé que les cellules déplétées pour Ino80 ou YY1 présentent des défauts d'activité de la réparation par RH. De façon surprenante, les auteurs observent que YY1 est capable de fixer des jonctions de Holliday *in vitro*, YY1 présente même plus d'affinité pour cette structure que pour de l'ADN double brin linéaire

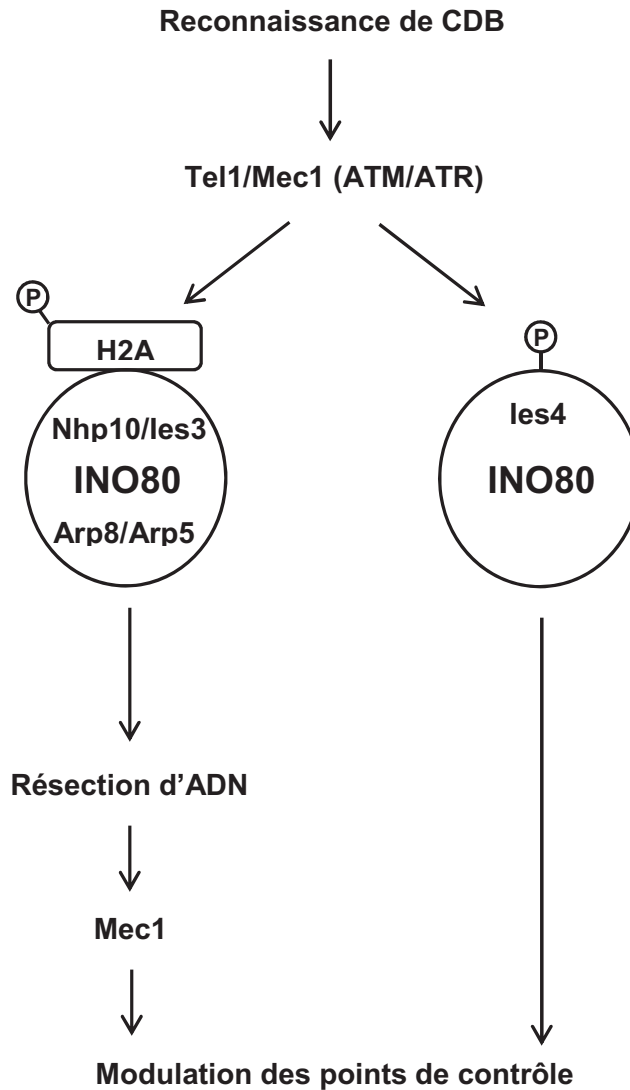


Figure 5. INO80 dans l'adaptation des points de contrôle en réponse aux cassures double brin. Les kinases Tel1/Mec1 (ATM/ATR chez l'homme) régulent deux aspects d'INO80 lorsqu'une cellule est exposée à des agents causants des dommages à l'ADN. Un de ces aspects est initié par la reconnaissance des CDB par le complexe MRX (MRN chez l'homme) conduisant à l'activation de Tel1. Tel1 phosphoryle alors de nombreuses protéines impliquées dans la réparation dont l'histone H2A (H2AX chez l'homme). La phosphorylation d'H2A conduit au recrutement d'INO80 au site endommagé. INO80 peut ainsi faciliter la résection de l'ADN par son habilité à remodeler la chromatine. La formation d'ADN simple brin conduit à l'activation de Mec1 qui bloque le cycle cellulaire par une cascade de phosphorylation conduisant à l'inhibition de kinases cycline-dépendantes. Le second aspect est la phosphorylation de Ies4 qui influence également la réponse des points de contrôle.

Pour partie tiré de Morrison *et al.* (2007) *Cell*. **130** : 499-511

(Wu *et al.*, 2007). Ce résultat laisse supposer que le complexe INO80 est ciblé sur les intermédiaires de recombinaison via YY1 et fonctionne pour faciliter la RH.

- *Recrutement du complexe INO80 aux CDB*

Supportant l'idée que le complexe hINO80 a un rôle direct dans la réparation des cassures double brin, Kashiwaba et ces collègues montrent, par immunofluorescence, que ce complexe est recruté sur de l'ADN endommagé par laser (Kashiwaba *et al.*, 2010). Par contre, les auteurs montrent que le recrutement d'INO80 sur l'ADN endommagé est dépendant de la sous-unité Arp8, tandis que la délétion de *ARP8* dans une souche de levure n'a pas d'effet sur le recrutement de INO80 aux CDB (Kashiwaba *et al.*, 2010 ; Morrison *et al.*, 2004). De plus, H2AX n'est pas nécessaire pour la localisation d'INO80 aux dommages générés par laser (ni Pontin ou Reptin), indiquant que le mécanisme de recrutement d'INO80 n'est pas conservé (Kashiwaba *et al.*, 2010). Les traitements au laser ne génèrent pas seulement des cassures double brin, il est donc possible que dans ces expériences, le recrutement d'INO80 observé ne concerne pas ou qu'en partie des CDB.

La confirmation que le complexe INO80 de mammifères est bien recruté sur une cassure double brin a récemment été apportée par Gospodinov *et al.* (2011). L'analyse par ChIP autour d'un site de clivage AsiSI dans des cellules U2OS révèle qu'INO80 est enrichi près de trois fois à 500 pb de la cassure (Gospodinov *et al.*, 2011).

- *INO80 dans la résection*

Comme attendu pour un complexe impliqué dans la recombinaison, le complexe hINO80 facilite la résection de l'ADN (Gospodinov *et al.*, 2011).

Par immunofluorescence, Gospodinov *et al.* ont observé qu'après traitement par rayonnements ionisants de cellules humaines, la quantité d'ADN simple brin formée est beaucoup moins importante dans les cellules déplétées pour hIno80 que dans des cellules sauvage (Gospodinov *et al.*, 2011). De plus, la formation du filament de RPA sur cet ADN simple brin est fortement compromise dans des cellules dont la quantité de hIno80 ou de hArp8 est inférieure aux cellules sauvages (Gospodinov *et al.*, 2011).

Notons que hPontin (Anna Kalashnikova, Odile Humbert, Christophe Papin, Mikhaïl Grigoriev résultats non publiés) et hReptin possèdent *in vitro* une activité hélicase ATP-dépendante orienté de 3' vers 5' sur un substrat possédant une extrémité 3' sortante simple brin de 30 nucléotides minimum (Papin *et al.*, 2010). Ce type d'activité étant impliqué dans le traitement de la résection d'extrémité d'ADN (Longhese *et al.*, 2010), il est possible que les protéines hPontin et hReptin soient nécessaires pour la résection d'ADN dépendante d'hINO80.

- *Un rôle indirect dans la réparation des cassures doubles brin*

Enfin, le complexe INO80 de métazoaires a également un rôle indirect dans la réparation des cassures doubles brin par la régulation transcriptionnelle de certains gènes de la réparation.

Comme attendu pour un complexe qui engage la recombinaison, la déplétion de hIno80 est hypersensible aux radiations ionisantes et montre un retard dans la réparation des lésions (Park *et al.*, 2010). Cependant, dans cette étude, les auteurs montrent également que les gènes codant pour les protéines de la réparation RAD54 et XRCC3 sont transcriptionnellement régulés à la baisse dans des cellules dont le niveau de hIno80 est plus faible que des cellules sauvages (Park *et al.*, 2010). En réintroduisant la transcription de ces gènes, les auteurs montrent que les défauts dans la réparation des lésions de l'ADN dans des cellules déficientes en hIno80 sont largement restaurés (Park *et al.*, 2010).

Notons que la déplétion d'YY1, bien que présentant des défauts dans la réparation des dommages de l'ADN, ne laisse apparaître aucun effet sur l'expression des gènes de la réparation (Wu *et al.*, 2007). Il est donc raisonnable de penser que le complexe INO80 doit avoir un double rôle, direct et indirect, dans la réparation des cassures double brin chez les mammifères. Probablement, sa contribution directe ou indirecte dépend du type cellulaire et/ou de la phase de croissance.

2) Le complexe INO80 dans la régulation de la transcription

Le rôle du complexe INO80 dans la régulation transcriptionnelle a principalement été étudié chez la levure. La protéine yIno80 fut initialement découverte comme impliquée dans la régulation de l'expression de gènes en aval de nombreuses voies de signalisation (Ebbert *et*

al., 1999). Dès lors, des expériences de puces à ADN mettent en évidence que le complexe INO80 contribue à la régulation positive et négative de plus de 20% du génome de levure (Jónsson *et al.*, 2004 ; Mizuguchi *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2004) et de plante (Fritsch *et al.*, 2004). Il semble qu'INO80 régule directement tous ces gènes, au moins chez la levure. Plus encore, INO80 pourrait directement participer à la régulation transcriptionnelle de l'ensemble des gènes de levure. En effet, ce complexe est présent sur quasiment tous les gènes de la levure comme le montrent les analyses par ChIP de la distribution des sous-unités yIno80 ou de yArp5 sur l'ensemble du génome (Shimada *et al.*, 2008 ; Yen *et al.*, 2012 ; Yen *et al.*, 2013). Par contre, INO80 n'est pas essentiel dans l'expression des gènes dont il participe à la régulation mais semblerait plutôt affecter leurs cinétiques d'expression en collaboration avec plusieurs autres complexes de régulation de la chromatine (Barbaric *et al.*, 2007 ; Ford *et al.*, 2007).

Deux mécanismes peuvent expliquer le rôle du complexe INO80 dans la régulation transcriptionnelle. Premièrement, par son activité de remodelage de nucléosomes, le complexe INO80 doit pouvoir déplacer ou retirer des nucléosomes sur les promoteurs afin d'en faciliter ou limiter l'accès à la machinerie transcriptionnelle. Cette idée est appuyée par l'analyse des signaux de ChIP sur la disposition des nucléosomes obtenus sur l'ensemble du génome pour les gènes fixés par INO80. Dans cette expérience, la délétion des sous-unités yIno80 ou yArp5 entraîne une relocalisation des nucléosomes disposés sur ces gènes (Yen *et al.*, 2012).

Le second mécanisme concerne l'activité d'échange d'histones du complexe INO80. Chez la levure, le premier nucléosome positionné en 3' du site d'initiation de la transcription est connu pour engager la machinerie transcriptionnelle (Rhee et Pugh, 2012) et donc il est potentiellement sujet à de nombreuses régulations. Un des événements régulateurs inclut la dynamique d'échange entre l'histone H2A et le variant d'histone Htz1 (H2A.Z chez l'homme) sur ce nucléosome (Guillemette *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005). Si le complexe SWR1 est responsable de l'incorporation de l'histone Htz1 (Mizuguchi *et al.*, 2004), le groupe de Peterson démontre que le complexe INO80 est responsable du remplacement de Htz1 par H2A au promoteur de nombreux gènes après leurs inductions (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011). Ce rôle de yINO80 dans le retrait de Htz1 du promoteur a été confirmé récemment par ChIP à haute résolution réalisé sur plus de 4900 gènes chez la levure bourgeonnante (Yen *et al.*, 2013).

Chez la levure, la délétion d'yIno80 ou la déplétion de yReptin conduisent à la dérégulation d'un jeu de gènes similaires (Jónsson *et al.*, 2004 ; Ohdate *et al.*, 2003). De plus, les protéines yPontin et yReptin sont essentielles à l'assemblage fonctionnel du complexe INO80 (Jónsson *et al.*, 2004). Ces études suggèrent que les protéines Pontin et Reptin peuvent agir au sein de ce complexe dans la régulation transcriptionnelle. Pourtant la fixation des protéines yPontin et yReptin sur cinq promoteurs cibles du complexe INO80 n'a pas pu être détectée par ChIP (Jónsson *et al.*, 2004). Une explication possible serait d'envisager que les protéines yPontin et yReptin ne soient plus accessibles aux anticorps utilisés pour cette ChIP une fois qu'elles sont fixées au promoteur au sein d'INO80. Une autre éventualité est de considérer que les protéines Pontin et Reptin ne s'associent que transitoirement avec INO80 afin de l'activer.

En accord avec cette hypothèse, l'analyse structurale par cryo-microscopie électronique du complexe INO80 purifié chez la levure montre qu'au moins deux types d'assemblage de ce complexe sont présents dans l'échantillon analysé (Tosi *et al.*, 2013). Un de ces assemblages comporte une tête coudée correspondant aux protéines yPontin et yReptin sous une forme dodécamérique suivie du reste du complexe (**Figure 6**). Le second assemblage, dont la modélisation tridimensionnelle n'a pas été réalisée, est dépourvu de cette tête coudée et donc probablement des protéines yPontin et yReptin, suggérant qu'yINO80 puisse s'assembler en différents sous complexes avec ou sans yPontin et yReptin (Tosi *et al.*, 2013). On peut alors envisager que le complexe dépourvu de yPontin et yReptin puisse exister à l'état latent, puis activé par l'assemblage de yPontin et yReptin.

C) Le complexe SRCAP (SWR1 chez la levure)

Le complexe SRCAP/SWR1 a été mis en évidence suite à un criblage génétique chez la levure visant à identifier de nouveaux gènes impliqués dans la modification de la chromatine et dans l'élongation de l'ARN polymérase II (Krogan *et al.*, 2003). Parmi les cinq gènes candidats obtenus dans ce crible, Krogan *et al.* retrouvent le gène codant le variant d'histone Htz1 (H2A.Z chez l'homme) ainsi que trois gènes codant des sous-unités du complexe SWR1 (Krogan *et al.*, 2003). Cette étude montre également que l'intégrité du complexe SWR1 est nécessaire pour l'incorporation de Htz1 dans la chromatine *in vivo* (Krogan *et al.*, 2003). De plus, des analyses génétiques indiquent que SWR1 et Htz1 fonctionnent ensemble pour réguler la transcription de nombreux gènes, la résistance aux

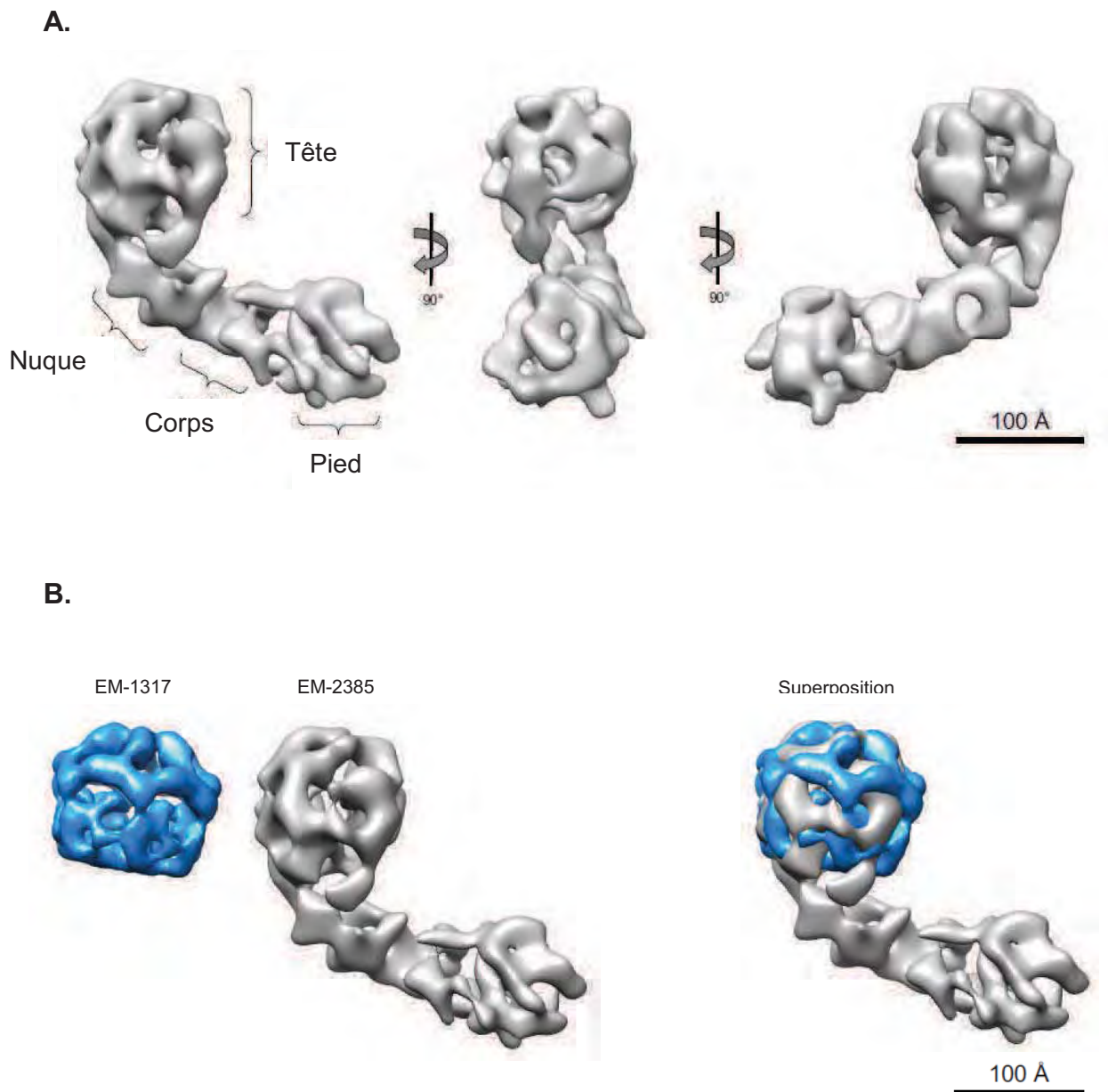


Figure 6. Structure tridimensionnelle du complexe INO80. **A.** Carte de densité aux électrons modélisée sur la base de microscopie électronique à coloration négative (Code EMDB : 2385). Cette structure peut se cartographier en quatre modules : La tête connectée au corps et au pied par la nuque. **B.** La tête du complexe INO80 correspond à un dodécamère de Pontin et Reptin. Comparaison de la carte de densité aux électrons du dodécamère hPontin et hReptin (Puri *et al.*, 2007) (Code EMDB : 1317) avec celle du complexe INO80. Si la structure du dodécamère humain ne se superpose pas parfaitement avec la tête du complexe INO80, leur volume est tout-à-fait similaire.

(A) D'après Tosi *et al.* (2013) *Cell*. **154**, 1207-1219

(B) Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8) <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

agents causant des dommages à l'ADN ainsi qu'au stress réplcatif (Krogan *et al.*, 2003). Subséquemment, des résultats similaires ont été obtenus par Kobor *et al.* (2004).

Ces analyses génétiques laissaient entrevoir la possibilité que le complexe SWR1 pouvait directement catalyser la réaction d'incorporation de l'histone Htz1 dans le génome. Cette prédiction fut confirmée par une suite de tests biochimiques montrant que le complexe SWR1 remplace les dimères H2A/H2B d'un substrat nucléosomal par des dimères Htz1/H2B dans une réaction ATP-dépendante (Mizuguchi *et al.*, 2004). Cette réaction d'échange de dimères d'histone peut être stimulée par l'acétylation des histones H4 et/ou H2A dans le substrat nucléosomal (Altaf *et al.*, 2010). De plus, l'affinité du complexe SWR1 pour les nucléosomes est d'autant plus grande que leur ADN extra-nucléosomal est long (Ranjan *et al.*, 2013). Cette activité d'échange d'histone a également été retrouvée avec le complexe de mammifère SRCAP (pour SWI2/SNF2-Related CBP Activator Protein) (Cai *et al.*, 2005 ; Ruhl *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2007).

1) Le complexe SRCAP/SWR1 dans la réparation des cassures double brin

Tout comme pour yIno80, les souches délétées pour ySwr1 sont hypersensibles à des agents causant des cassures double brin. SWR1 est recruté aux sites de cassure précocement par une interaction directe entre sa sous unité Arp4 et l'histone H2A phosphorylée (Downs *et al.*, 2004 ; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006 ; van Attikum *et al.*, 2007).

a) Activité du complexe Swr1 aux abords d'une CDB

Contrairement aux autres complexes de la famille SWI2/SNF2, l'activité ATPase du complexe SWR1 n'est que très faiblement stimulée par de l'ADN ou des nucléosomes (Mizuguchi *et al.*, 2004). SWR1 ne possède pas, non plus, la capacité de déplacer un nucléosome. Par contre, chez la levure, ce complexe est le seul capable d'incorporer le variant d'histone Htz1 dans le génome. Il est donc légitime de supposer que le rôle du complexe SWR1 à la CDB et d'incorporer Htz1. En utilisant le système HO pour introduire une CBD au locus *MAT* de *S. cerevisiae*, Kalocsay *et al.* montrent par ChIP que Htz1 est enrichie rapidement, mais transitoirement, à proximité d'une CDB (Kalocsay *et al.*, 2009).

Cette cinétique d'incorporation de l'histone Htz1 en périphérie d'une cassure suggère que cette histone doit avoir un rôle dans les étapes précoces de la réparation. En accord avec

cette hypothèse, Kalocsay *et al.* (2009) montrent par ChIP que l'un des premiers événements observés suite à une cassure double brin, la phosphorylation de l'histone H2A, est drastiquement diminué dans des souches dépourvues de l'histone Htz1. De plus, ils observent que la délétion de Htz1 ralentit la résection d'ADN, concomitant à un délai dans le recrutement de RPA en réponse à une CDB (Kalocsay *et al.*, 2009). Assimilé au défaut de résection d'ADN, la délétion de Htz1 ou Swr1 affecte partiellement la signalisation des points de contrôle, se traduisant par une diminution de la phosphorylation de Rad53 en réponse à l'induction de CDB dans ces souches mutantes comparées aux souches sauvages (Kalocsay *et al.*, 2009).

b) Implication du complexe SWR1 dans la réparation par RH et dans la réparation par NHEJ

Par son rôle dans le recrutement de Rad51, SWR1 doit être impliqué dans la réparation par RH (Kalocsay *et al.*, 2009). Nous pouvons également supposer que ce complexe participe au NHEJ puisque le recrutement de yKu80, protéine initiant le NHEJ, est retardé dans une souche dépourvue de ySwr1 comparé aux cellules sauvages (van Attikum *et al.*, 2007).

c) SRCAP/SWR1 dans la réparation des cassures double brin chez les eucaryotes supérieurs

Les effets du complexe SWR1 sur la réparation des CDB observés chez la levure sont difficilement transposables chez les métazoaires. D'après Kalocsay *et al.* (2009), ces effets sont directement liés à l'incorporation de l'histone Htz1 (H2A.Z chez l'homme et les plantes, H2Av chez la drosophile). Or, SRCAP/SWR1 n'est pas le seul complexe capable d'insérer l'histone H2A.Z dans le génome des eucaryotes supérieurs. La protéine p400 est l'une des orthologues de ySwr1 chez l'homme, la seconde étant SRCAP. p400 est souvent associée au complexe de remodelage TIP60 et présente également une activité d'échange d'histone H2A.Z ATP-dépendante *in vitro* (Gévry *et al.*, 2007). Récemment, des travaux menés chez les mammifères montrent que p400 et H2A.Z sont requises pour créer une configuration ouverte de la chromatine autour des CDB, permettant le recrutement de protéines de la réparation impliquées dans la RH, Rad51 et BRCA1 (Courilleau *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2010). Ainsi, soit p400 et SRCAP coopèrent dans l'incorporation de H2A.Z en périphérie des cassures, soit l'incorporation de H2A.Z dans le génome requiert l'un ou l'autre de ces complexes suivant le

contexte cellulaire et enfin, SRCAP c'est peut être spécialisé dans d'autres processus comme la régulation transcriptionnelle.

Cependant, une étude réalisée chez *Arabidopsis thaliana* implique le complexe SRCAP/SWR1 dans la réparation des cassures double brin chez les métazoaires, plus précisément dans la RH (Rosa *et al.*, 2013). Bien que ce complexe n'ait pas encore été caractérisé chez cet organisme, trois sous-unités du complexe putatif SRCAP/SWR1 d'*A. thaliana* (atSWR1) ont été identifiées et étudiées : l'orthologue de ySwr1, atPie1 (Photoperiod-Independent Early flowering 1) ; atArp6 et atSwc6 (SWR1 Complex 6). La mutation de chacun des gènes correspondant à ces protéines provoque des phénotypes morphologiques et développementaux similaires, incluant une floraison précoce, une réduction globale de la taille de la plante, des feuilles ondulées et une réduction de la fertilité (March-Díaz et Reyes, 2009). De plus, atPie1 et atArp6 sont requises pour l'incorporation de l'histone H2A.Z dans le génome (Deal *et al.*, 2007), et leurs pertes altèrent la transcription de nombreux gènes (Kumar et Wigge, 2010 ; March-Díaz *et al.*, 2008). Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que ces protéines peuvent appartenir à un même complexe, qui en toute probabilité doit s'apparenter au complexe SRCAP/SWR1.

Tout comme chez la levure, l'altération du complexe atSWR1 par la délétion de atPie1, atArp6 ou atSwc6 est hypersensible à de nombreux agents causant des dommages à l'ADN. Bien que ces protéines participent à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes, leurs délétions n'affectent pas l'expression des protéines impliquées dans la réparation, supportant l'idée que le complexe at-SWR1 est directement impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN (Rosa *et al.*, 2013). De plus, atArp6 et atSwc6 interagissent génétiquement avec une protéine de la réparation par RH, atBrca1 mais pas avec une protéine de la réparation par NHEJ, atKu70 (Rosa *et al.*, 2013). Sur la base d'un système rapporteur de réparation par RH suite à une CDB, Rosa *et al.* confirment que atPie1 facilite la RH (Rosa *et al.*, 2013).

2) Le complexe SRCAP/SWR1 dans la régulation de la transcription

Par leur activité d'incorporation de l'histone H2A.Z (Htz1 chez la levure) dans le génome (Cuadrado *et al.*, 2010 ; Kobor *et al.*, 2004 ; Krogan *et al.*, 2003 ; Mizuguchi *et al.*, 2004 ; Ruhl *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2005), le rôle des complexes

SRCAP/SWR1 dans la régulation transcriptionnelle est directement lié à la fonction de l'histone H2A.Z.

Chez la levure, H2A.Z est distribué au niveau des promoteurs de gènes principalement transcrits par l'ARN polymérase II sur deux nucléosomes spécifiques entourant le site initiateur de la transcription (TSS) (Albert *et al.*, 2007 ; Guillemette *et al.*, 2005 ; Raisner *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005). Cette localisation flanque une région dépourvue de nucléosome (NFR pour Nucleosome Free Region) et est importante pour la régulation de la transcription. Récemment, il a été proposé que le ciblage du complexe SWR1 sur les promoteurs soit principalement dû à son affinité pour l'ADN nu, et donc pour le NFR (Ranjan *et al.*, 2013). Chez les eucaryotes supérieurs, le même enrichissement a été observé autour du TSS (Barski *et al.*, 2007).

Chez la levure, H2A.Z est retrouvée sur les promoteurs de gènes inactifs ou faiblement actifs et tend à être perdu après l'activation de ces gènes. L'enrichissement d'H2A.Z est inversement corrélé avec le niveau de transcription des gènes chez la levure (Guillemette *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2005 ; Millar *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2005). Cependant, l'opposé est observé dans des cellules humaines ou de drosophiles, où l'enrichissement d'H2A.Z sur les promoteurs est corrélé avec le niveau d'expression de ces gènes (Barski *et al.*, 2007 ; Mavrich *et al.*, 2008). Alors que l'histone H2A.Z est préférentiellement localisée sur le promoteur de gènes actifs chez les eucaryotes supérieurs, elle tend également à être perdue après l'activation de la transcription. Ainsi, il a été proposé que les nucléosomes contenant H2A.Z préparent les gènes pour leur activation (Guillemette *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005).

Il y a une corrélation positive générale entre le niveau de H2A.Z et celui de l'ARN polymérase II sur les promoteurs en cellules humaines (Hardy *et al.*, 2009). Il est donc proposé qu'H2A.Z peut aider au recrutement de la machinerie transcriptionnelle en changeant localement la structure de la chromatine sur les promoteurs en pause et par le recrutement d'activateurs transcriptionnels conduisant à la stimulation de la transcription (Adam *et al.*, 2001 ; Gligoris *et al.*, 2007 ; Hardy *et al.*, 2009 ; Lemieux *et al.*, 2008).

Un rôle additionnel dans la régulation de l'élongation de la transcription a également été proposé suite à la cartographie sur l'ensemble du génome de drosophile des facteurs participant à l'élongation de la transcription sur les nucléosomes contenant H2A.Z (Weber *et al.*, 2010). De plus, une étude démontre qu'il y a des interactions génétiques entre les gènes

codants les facteurs de l'élongation et H2A.Z, suggérant qu'H2A.Z doit avoir un rôle positif durant l'élongation (Santisteban *et al.*, 2011).

H2A.Z a aussi été décrit pour permettre la mémoire transcriptionnelle par sa relocalisation du nucléoplasme à la périphérie nucléaire suite à l'activation transcriptionnelle (Brickner *et al.*, 2007). Chez la levure, la mémoire épigénétique transcriptionnelle a été liée à l'augmentation de la déposition d'H2A.Z aux promoteurs de gènes inductibles (Brickner *et al.*, 2007 ; Brickner, 2009 ; Halley *et al.*, 2010 ; Kelly *et al.*, 2010). Toutefois, un rôle direct d'H2A.Z dans la mémoire transcriptionnelle est débattu (Halley *et al.*, 2010 ; Kundu et Peterson, 2010 ; Light *et al.*, 2010) et une telle fonction n'a pas été démontrée chez les eucaryotes supérieurs.

Enfin, H2A.Z est également enrichie dans les régions euchromatiniennes qui flanquent les zones hétérochromatiniennes (Krogan *et al.*, 2003 ; Meneghini *et al.*, 2003). Chez la levure, ces régions sont retrouvées au niveau des télomères, des *loci* silencieux tels que les *HMR* et *HML*, et de l'ADN ribosomique. En absence de H2A.Z, l'hétérochromatine s'étale dans l'euchromatine et réprime l'expression des gènes situés dans cette région (Krogan *et al.*, 2003 ; Meneghini *et al.*, 2003). Un rôle similaire de H2A.Z a été proposé chez les métazoaires après avoir trouvé H2A.Z dans les régions insultrices du locus β -globin chez le poulet (Bruce *et al.*, 2005) et parce qu'il y a une corrélation entre H2A.Z et la protéine insultrice CTCF en cellules humaines (Barski *et al.*, 2007 ; Fu *et al.*, 2008).

Bien que chez la levure, il est fermement démontré que la déposition d'H2A.Z sur l'ensemble du génome est dépendante du complexe SWR1 (Kobor *et al.*, 2004 ; Krogan *et al.*, 2003 ; Mizuguchi *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2005), chez la drosophile ce rôle est dépendant du complexe dTIP60 et chez les mammifères, on retrouve deux homologues fonctionnels de la protéine ySwr1, SRCAP et p400. Chacune de ces protéines est retrouvée dans un complexe différent qui conserve l'activité d'incorporation de H2A.Z *in vitro* et *in vivo*. SRCAP est contenue dans un complexe portant son propre nom (Cai *et al.*, 2005 ; Cuadrado *et al.*, 2010 ; Ruhl *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2007) et p400 est le plus souvent associée au complexe TIP60 (Couture *et al.*, 2012 ; Doyon *et al.*, 2004 ; Gévy *et al.*, 2007 ; Gévy *et al.*, 2009). Ces deux complexes incorporent l'histone H2A.Z sur des promoteurs qui leur sont propres (Couture *et al.*, 2012 ; Cuadrado *et al.*, 2010 ; Gévy *et al.*, 2007 ; Gévy *et al.*, 2009 ; Wong *et al.*, 2007). Les mécanismes de recrutement de ces complexes sur les promoteurs ne sont pas encore

élucidés mais on peut supposer qu'ils engagent des interactions spécifiques avec différents co-activateurs et/ou différentes marques chromatiniennes. Par exemple, les premières études sur la caractérisation de la fonction de SRCAP indiquent que cette protéine interagit avec l'histone acétyl transférase « CREB Binding Protein » (CBP) et fonctionne comme un co-activateur pour certains facteurs de transcription interagissant avec CBP incluant CREB, le récepteur androgène et le récepteur aux glucocorticoïdes (Monroy *et al.*, 2001 ; Monroy *et al.*, 2003).

3) Rôle des protéines Pontin et Reptin dans le complexe SRCAP/SWR1

Parmi les complexes de la famille INO80, les interactions physiques entre les sous-unités de ces complexes ont été les plus étudiés pour SWR1 (Nguyen *et al.*, 2013 ; Wu *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2009). Ces études mettent en avant que le complexe SWR1 est formé par deux modules protéiques. Un de ces modules est composé des protéines Arp4, Act1, Swc4, Bdf1, Swc7 et Yaf9 (Module-N) qui s'assemblent sur la région N-terminale de Swr1. L'autre module est composé des protéines Swc2, Swc3, Arp6 et Swc6 (Module-C) et s'assemble en C-terminal de Swr1. La protéine Swc5 interagit à la jonction entre la région N-terminale et le domaine ATPase de Swr1 et les protéines Pontin et Reptin, quant à elles interagissent avec la région insérée dans le domaine ATPase de Swr1 (**Figure 7A**) (Wu *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2009). Parmi les 9 sous-unités étudiées, Arp4, Arp6, Yaf9 Swc2, Swc5, Swc6 et Swr1 sont nécessaires pour l'activité d'échange d'histone de SWR1, alors que Bdf1, Swc7 et Swc3 sont dispensables pour cette activité. Ces trois sous-unités (Bdf1, Swc7 et Swc3) apparaissent donc avoir un rôle auxiliaire dans l'activité du complexe SWR1 (Wu *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2009). La nécessité des protéines Pontin et Reptin n'a pas été étudiée dans ces travaux. Par contre, chez l'homme une étude *in vitro* montre que les protéines recombinantes hPontin et hReptin coopèrent pour effectuer une activité d'échange d'histone H2A par son variant d'histone H2A.Z sur des mononucléosomes reconstitués (Choi *et al.*, 2009). Cette même étude montre que la déplétion de la protéine hPontin dans des cellules 293T entraîne une diminution significative du taux de H2A.Z incorporé dans le génome (Choi *et al.*, 2009). On peut donc supposer que les protéines Pontin et Reptin doivent avoir un rôle non négligeable dans l'activité d'échange d'histone des complexes SRCAP et SWR1.

Récemment, la structure tridimensionnelle du complexe SWR1 a été modélisée à partir d'images de cryo-microscopie électronique (Nguyen *et al.*, 2013). L'analyse de cette

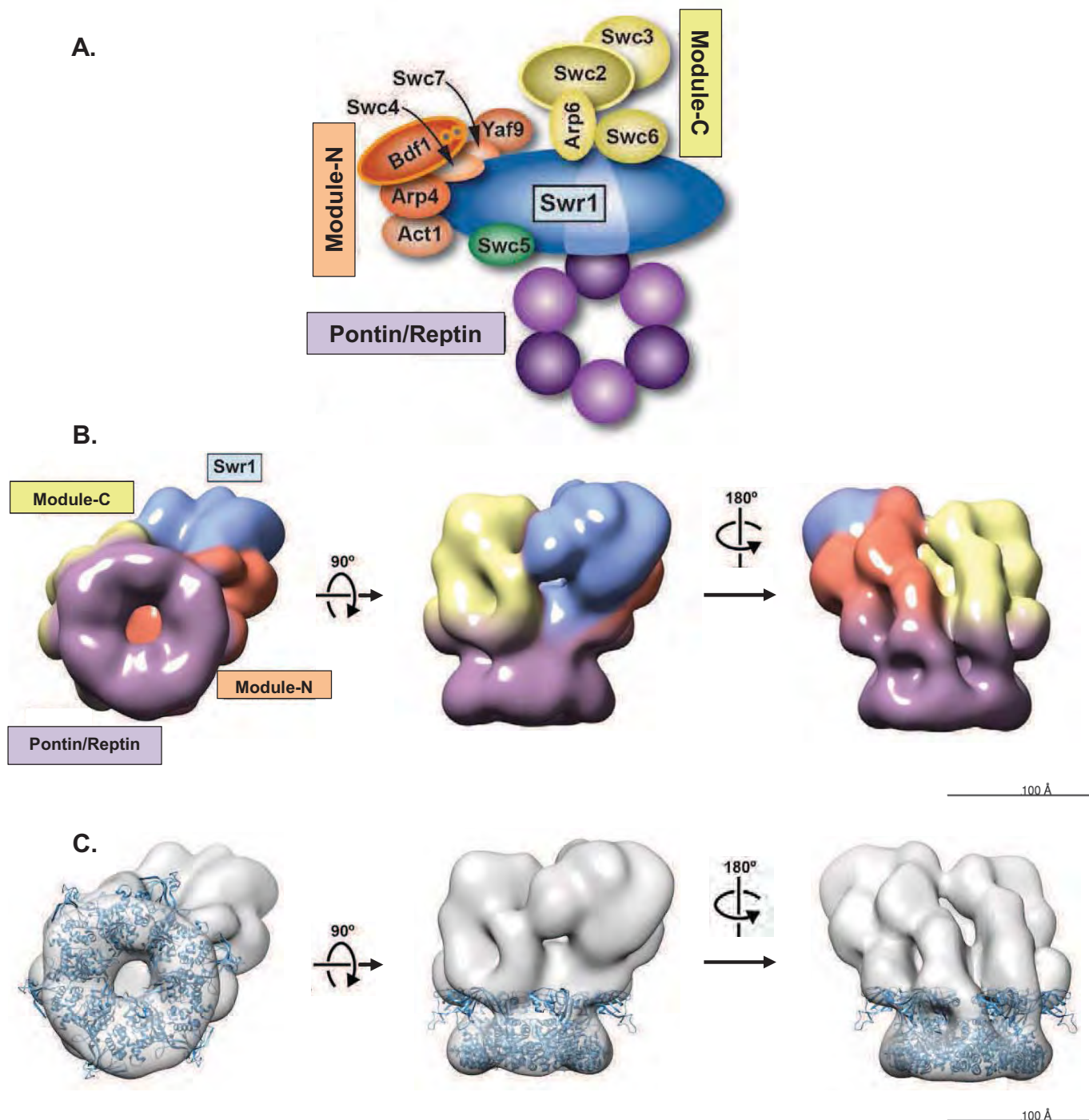


Figure 7. Organisation des sous-unités au sein du complexe SWR1 et structure tridimensionnelle. **A.** Schéma représentant l'organisation en modules des sous-unités du complexe SWR1. La sous-unité catalytique Swr1 en bleu est représentée suivant la convention, de son extrémité N-terminale à gauche, à son extrémité C-terminale à droite. La zone bleue clair au sein de Swr1 représente son domaine ATPase. Chaque protéine d'un même module est colorée suivant le même code. La disposition des différentes sous-unités est basée d'après les travaux de Wu *et al.* (2005) et Wu *et al.* (2009). **B.** Modélisation tridimensionnelle du complexe SWR1 issue d'image de cryo-microscopie électronique (Code EMDB : 5626). Les zones de la structure correspondant aux modules ou protéines du complexe SWR1 sont colorées suivant le même code qu'en **A**. **C.** La structure cristallographique de l'hexamère de hPontin (Code PDB : 2CO9) intégrée au complexe SWR1.

(A) et (B) D'après Nguyen *et al.* (2013) *Cell*. **154** : 1220-1231.

(C) Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8) [http:// www.cgl.ucsf.edu/chimera/](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/).

structure conduit les auteurs à proposer que les protéines Pontin et Reptin servent de plateforme d'assemblage permettant de connecter tous les modules fonctionnels du complexe SWR1. Pontin et Reptin sont assemblées sous la forme d'un hétéro-hexamère dans ce complexe (Nguyen *et al.*, 2013). Cet hétéro-hexamère est disposé de telle sorte que les domaines DII de Pontin et Reptin sont dirigés vers le reste du complexe SWR1 (**Figure 7B**). Cette disposition permet aux protéines Pontin et Reptin d'être en contact avec Swr1 et également avec les modules -N et -C (Nguyen *et al.*, 2013). De plus, les modules -N et -C peuvent s'assembler indépendamment l'un de l'autre et sans défaut structural apparent avec les protéines Swr1 et l'hexamère Pontin-Reptin. Pris dans leur ensemble, ces observations laissent supposer que Pontin et Reptin puissent servir de plateforme d'assemblage du complexe SWR1.

D) Le complexe TIP60/NuA4

Le complexe TIP60 est composé d'une quinzaine de sous-unités dont l'Histone AcétylTransférase (HAT) Tip60, l'ATPase de la famille Swi2/Snf2 p400 et les protéines Pontin et Reptin. *In vitro*, ce complexe possède les activités ATPase, hélicase 3' vers 5' et HAT préférentiellement sur les histones H2A et H4 (Doyon *et al.*, 2004 ; Ikura *et al.*, 2000). Par sa sous-unité p400 (domino chez la drosophile), ce complexe porte également une activité d'échange d'histone H2A par son variant H2A.Z (H2Av chez la drosophile) (Gévry *et al.*, 2007 ; Kusch *et al.*, 2004).

Par des expériences biochimiques, l'équipe de Dutta démontre que les protéines hPontin et hReptin sont essentielles pour l'activité HAT du complexe hTIP60 (Jha *et al.*, 2008 ; Jha *et al.*, 2013). En effet, un complexe hTIP60 purifié dépourvu de hPontin et hReptin (hTIP60 Δ PR) ne peut plus acétyler des nucléosomes *in vitro*. Jha *et al.* (2013) observent que la perte de l'activité HAT de hTIP60 est due à la sous-unité p400 qui, par son domaine swi2, inhibe Tip60. Un complexe hTIP60 Δ PR Δ p400 possède une activité HAT *in vitro*, mais l'ajout du domaine swi2 de p400 est suffisant pour inhiber hTIP60 Δ PR Δ p400. Parce que Pontin et Reptin interagissent avec p400 sur son domaine swi2, Jha *et al.* (2013) proposent que la présence de Pontin et Reptin au sein du complexe hTIP60, lève l'effet répressif de p400 sur hTip60 (Jha *et al.*, 2013). Ces résultats sont en accords avec des études réalisées chez l'homme, montrant que la protéine hPontin est nécessaire à l'acétylation de l'histone γ -H2AX par hTIP60 et au remodelage chromatinien subséquent (Jha *et al.*, 2008). Notons que l'ajout

des protéines Pontin et Reptin ensemble, ou indépendamment l'une de l'autre, sur un complexe hTIP60 Δ PR est suffisant pour restaurer l'activité HAT du complexe.

Indépendamment de p400, les protéines Pontin et Reptin stabilisent l'activité catalytique du complexe TIP60 lorsque ce dernier est sujet à un stress thermique (Jha *et al.*, 2013). Ainsi, les protéines Pontin et Reptin sont essentielles pour maintenir l'activité HAT de TIP60, en partie en protégeant TIP60 de l'effet répressif de p400 mais également en stabilisant l'intégrité du complexe TIP60.

Chez la levure, un complexe HAT appelé NuA4 (Nucléosome Acétyltransférase de l'histone H4) partage 13 sous-unités communes au complexe TIP60 dont la protéine Esa1 (homologue fonctionnelle de la protéine TIP60) et la protéine Eaf1 (orthologue de p400) (Doyon *et al.*, 2004), mais ne possède pas les protéines yPontin et yReptin (**Tableau 2**). La sous-unité Eaf1 ne contient pas de domaine swi2, ce qui pourrait expliquer l'absence des protéines Pontin et Reptin au sein de ce complexe NuA4. De plus, si NuA4 est l'homologue fonctionnelle de TIP60 chez la levure, il ne possède aucune activité ATPase, hélicase ou d'échange d'histone, suggérant un rôle essentiel des protéines Pontin et Reptin dans ces activités au sein du complexe TIP60. Toutefois, il est difficile d'exclure l'éventualité que l'absence de ces activités pour NuA4 ne soit due à l'absence du domaine swi2 de la protéine Eaf1.

Notons qu'on ne retrouve pas les protéines SRCAP et p400 (respectivement ySwr1 et yEaf1) chez la drosophile, à la place on retrouve la protéine domino de la famille Swi2/Snf2 au sein du complexe TIP60 de drosophile (dTIP60). Ce complexe dTIP60 possède les fonctions des deux complexes TIP60 et SRCAP humains. Concomitant à cette observation, les propriétés des histones H2AX et H2A.Z humains (H2A et Htz1 chez la levure) sont cumulées dans l'histone H2Av chez la drosophile.

1) Le complexe TIP60 dans la réparation des cassures double brin

La première indication que la protéine Tip60 devait avoir un rôle dans la réparation des cassures double brin provient d'expériences de transfection en cellules HeLa dans lesquelles la surexpression d'un allèle dominant négatif de Tip60 dépourvue d'activité HAT réduit l'efficacité de la réparation des CDB (Ikura *et al.*, 2000). Cependant, ces expériences ne précisent pas si Tip60 est requise pour la détection des dommages, leurs signalisations ou leurs réparations. Par la suite, différents laboratoires ont laissé entendre que Tip60 pouvait

Espèce	Homme	Levure
Complexes	TIP60	NuA4
Sous-unités orthologues	P400	Eaf1
	hPontin et hReptin	
	Actin	Actin
	BAF53	Arp4
	GAS41	Yaf9
	DMAP1	Swc4
	YL-1	
	Brd8/TRC/p120	
	TRRAP	Tra1
	Tip60	Esa1
	MRG15, MRGX	Eaf3
	FLJ11730	Eaf6
	MRGBP	Eaf7
	EPC1, EPC-like	Epl1
	ING3	Yng2
Sous-unités uniques		Eaf5

Tableau 2. Composition des complexes hTIP60 et yNuA4 et présentation des orthologues.

être impliquée à tous ces niveaux au travers de plusieurs mécanismes en apparence indépendants.

a) *Tip60 détecte l'altération de la chromatine pour activer ATM*

- *Tip60 est un activateur d'ATM*

La protéine kinase ataxia telangiectasia-mutated (ATM ou Tel1 chez la Levure) est la protéine majeure de la réparation des CDB. ATM est rapidement activée suite à une CDB et catalyse de multiples événements de phosphorylation nécessaires pour l'activation des points de contrôle et pour les mécanismes de réparation. Les mécanismes de reconnaissance des CDB et l'activation subséquente d'ATM ne sont que partiellement connus et impliquent plusieurs phases (Lavin et Kozlov, 2007)

Plusieurs groupes ont clairement démontrés que le complexe trimérique Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) est requis pour l'activation de l'activité kinase d'ATM (Cerosaletti *et al.*, 2006 ; Difilippantonio *et al.*, 2005 ; Falck *et al.*, 2005 ; Uziel *et al.*, 2003). MRN est rapidement recruté aux CDB et par sa sous-unité Nbs1 elle permet le recrutement d'ATM et son activation. ATM est dimérique à l'état inactif, l'activation par Nbs1 conduit à une autophosphorylation d'ATM sur la sérine 1981, causant une dissociation du dimère et l'activation de nouvelles molécules d'ATM, indépendamment de leurs liaisons à une CDB. Parmi les nombreux substrats d'ATM, on retrouve les protéines Nbs1, Chk2 (Rad53 chez la levure) ou encore l'histone H2AX.

En plus de MRN, de nombreux facteurs supplémentaires contribuent à l'activation d'ATM. Par exemple, l'inactivation de MRN ne permet pas d'abolir complètement l'activation d'ATM. En effet, la perte des fonctions de MRN est associée à un retard significatif dans l'activation de la protéine kinase ATM lorsqu'un faible niveau de dommages est généré en cellule (Cerosaletti *et al.*, 2006 ; Difilippantonio *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2009 ; Uziel *et al.*, 2003) ; par contre, lorsque beaucoup de dommages sont générés, la perte de fonction du complexe MRN n'a que très peu d'effet sur l'activation d'ATM (Horejsí *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2002 ; Kitagawa *et al.*, 2004).

Des travaux menés chez les mammifères indiquent que Tip60 a un rôle direct dans l'activation d'ATM suite à une CDB. Récemment, il a été montré que Tip60 acétyle ATM sur

la lysine 3016 en réponse à une CDB (Jiang *et al.*, 2006 ; Kitagawa *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2005). L'activité acétyltransférase de Tip60 est stimulée suite à l'induction de CDB par rayonnements ionisantes, conduisant à l'acétylation d'ATM par Tip60 (Sun *et al.*, 2005). L'acétylation d'ATM par Tip60 dans des cellules dont l'ADN a été endommagé est nécessaire pour l'activation de l'activité kinase d'ATM. En effet, une mutation de la lysine 3016 d'ATM ou bien l'inactivation de Tip60 inhibe à la fois l'acétylation et l'activation d'ATM (Jiang *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2005). Plus encore, ni l'activité acétyltransférase de Tip60, ni l'acétylation d'ATM ne dépendent de l'activité kinase d'ATM, indiquant que Tip60 a un rôle clef dans l'activation d'ATM, probablement en amont de MRN.

- *Activation de Tip60 en réponse aux CDB*

Comment l'activité acétyltransférase de Tip60 est-elle régulée en réponse à une CDB ? De récentes études démontrent que le chromodomaine de Tip60 joue un rôle clé pour l'activation de l'activité acétyltransférase de Tip60 en réponse à une CDB (Kaidi et Jackson, 2013 ; Sun *et al.*, 2009). Les chromodomaines sont des domaines protéiques contenant des acides aminés hydrophobes conservés qui interagissent spécifiquement avec les lysines méthylés (Taverna *et al.*, 2007). Parce que Tip60 est recrutée aux CDB (Sun *et al.*, 2005), Sun *et al.* ont proposé que ce recrutement pouvait permettre l'interaction entre le chromodomaine de Tip60 et les résidus lysines méthylées sur la chromatine (Sun *et al.*, 2009). Il est maintenant évident que le chromodomaine de Tip60 interagit spécifiquement avec l'histone H3 triméthylée sur la lysine 9 (H3K9me3 : (Kaidi et Jackson, 2013 ; Sun *et al.*, 2009)). Cette interaction est dépendante de la phosphorylation de Tip60 sur la tyrosine 44 par la kinase c-Abl (Kaidi et Jackson, 2013). Les analyses *in vitro* et *in vivo* indiquent que la fixation de Tip60 phosphorylée sur H3K9me3 fonctionne comme un régulateur allostérique, augmentant l'activité catalytique de Tip60 (Kaidi et Jackson, 2013 ; Sun *et al.*, 2009). Des mutations sur les acides aminés hydrophobes du chromodomaine de Tip60 ou bien sur la tyrosine 44 bloquent à la fois la fixation de Tip60 sur H3K9me3 mais aussi l'activation de l'activité acétyltransférase de Tip60 en réponse aux dommages de l'ADN. Des expériences *in vivo* correspondantes démontrent que l'inactivation du chromodomaine de Tip60 ou la mutation du résidu tyrosine 44 inhibe l'activation de l'activité acétyltransférase de Tip60 par les dommages de l'ADN de même que l'acétylation et l'activation d'ATM (Kaidi et Jackson, 2013 ; Sun *et al.*, 2009). De plus, quand le niveau global de H3K9me3 est diminué, par la surexpression de déméthylases ou l'inactivation des méthylases de H3K9, l'activation de

Tip60 par les dommages à l'ADN ainsi que l'activation d'ATM sont significativement diminuées (Sun *et al.*, 2009). Le recrutement de Tip60 aux sites de CDB conduit donc à l'interaction entre le chromodomaine phosphorylé de Tip60 et l'histone méthylée H3K9me3 en périphérie d'une cassure. Cette interaction permet l'activité acétyltransférase de Tip60, l'acétylation d'ATM et l'activation d'ATM.

- *ATM, Tip60 et le complexe MRN*

Ces résultats démontrent un rôle clef de Tip60 dans l'activation d'ATM en réponse aux dommages de l'ADN mais il est important de noter que le complexe MRN est également critique dans ce processus. En effet, un complexe MRN fonctionnel est essentiel pour une activation efficace d'ATM, au moins lorsque les dommages à l'ADN ne sont pas trop nombreux (Cerosaletti *et al.*, 2006 ; Difilippantonio *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2009 ; Uziel *et al.*, 2003). Comme le propose l'équipe de Price, il est possible que le complexe MRN soit responsable du recrutement de Tip60 et d'ATM aux sites de cassure par sa capacité à fixer les extrémités d'ADN (Jiang *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2009) (**Figure 8**). Supportant cette idée, Tip60 (Chailleux *et al.*, 2010 ; Robert *et al.*, 2006) et ATM (Falck *et al.*, 2005 ; You *et al.*, 2005) interagissent physiquement avec MRN. De plus, l'inactivation du complexe MRN conduit à un défaut de recrutement de Tip60 et d'ATM aux CDB avec un retard dans l'acétylation et dans l'activation d'ATM dépendante de Tip60 (Kaidi et Jackson, 2013 ; Sun *et al.*, 2009 ; Falck *et al.*, 2005 ; You *et al.*, 2005).

De manière surprenante, une grande majorité d'ATM est liée à la protéine TIP60 *in vivo* (l'inverse n'est pas vrai) (Jiang *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2005). Par contre, aucune interaction physique n'a pu être observée entre Tip60 et ATM, suggérant qu'il doit exister une protéine capable de faire le pont entre Tip60 et ATM. Pontin et Reptin pourraient être ces intermédiaires puisque récemment elles ont été retrouvées en interaction avec ATM (Izumi *et al.*, 2010).

Déterminer la nature des interactions entre MRN, Tip60, ATM et probablement d'autres protéines du complexe TIP60 comme Pontin et Reptin, et comprendre comment un tel complexe fonctionne dans l'activation de Tip60 et d'ATM requerront une purification et une analyse biochimique minutieuse de ces complexes.

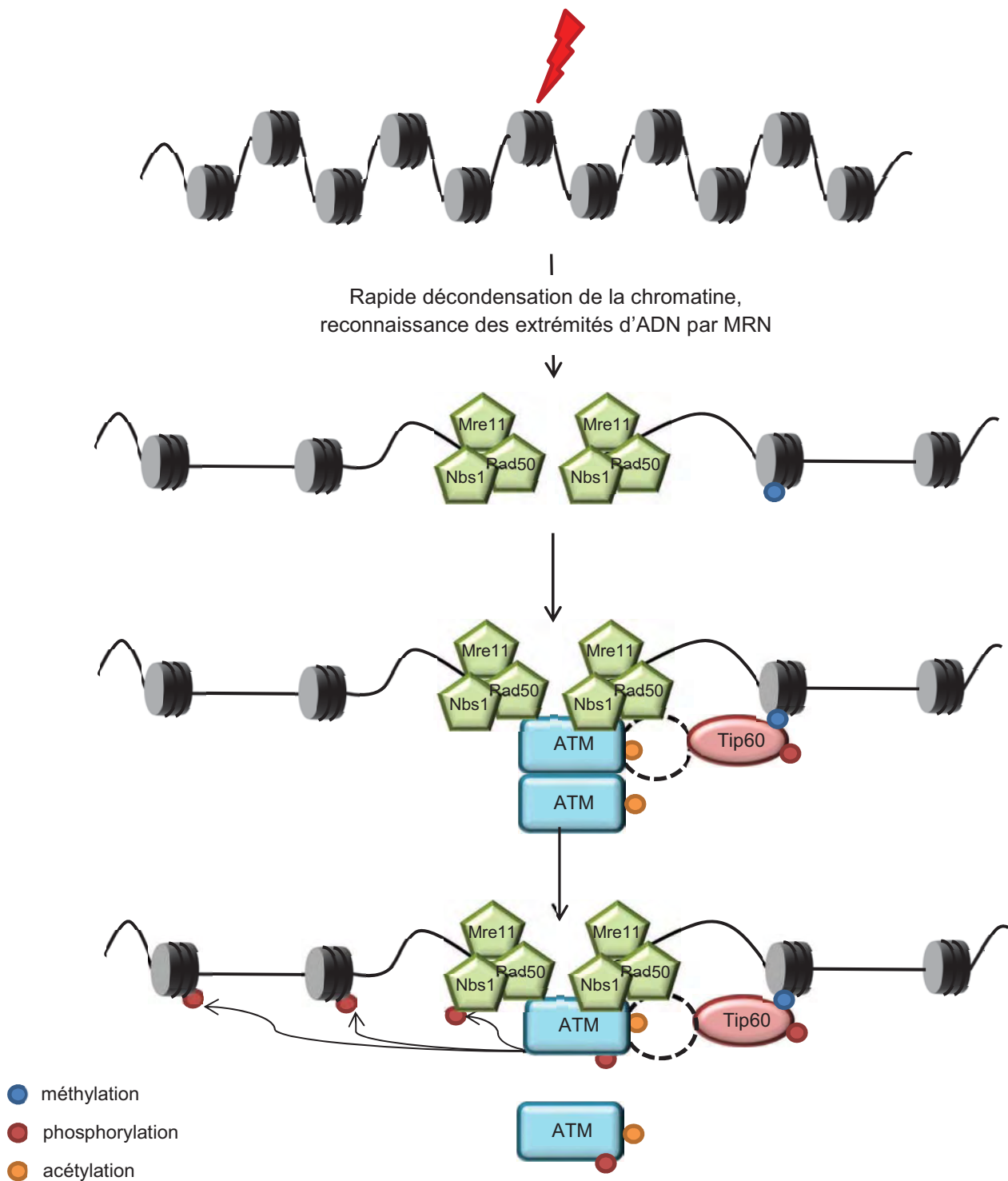


Figure 8. Un mécanisme pour l'activation d'ATM. Après l'apparition d'une CDB, MRN est recruté sur les extrémités d'ADN. La chromatine se décondense rapidement laissant apparaître certaines marques chromatinienne spécifiques comme des méthylations d'H3. L'intervention de méthyltransférases à cette étape n'est également pas à exclure. Le complexe inactif Tip60-ATM est recruté à la CDB par MRN, facilitant l'interaction entre le chromodomaine de Tip60 et H3K9me3, elle-même stabilisé par la phosphorylation de Tip60. Cette interaction stimule l'activité acétyltransférase de Tip60, conduisant à l'acétylation d'ATM. L'interaction entre MRN et ATM, combinée avec l'acétylation d'ATM par Tip60, active l'activité kinase d'ATM, permettant l'autophosphorylation d'ATM. Cette autophosphorylation conduit à la dissociation du dimère d'ATM, permettant à ATM de phosphoryler ses cibles comme Nbs1 ou l'histone H2AX.

b) Le complexe TIP60 et le remodelage de la chromatine aux CDB

L'empaquetage de l'ADN sous forme de nucléosomes représente une barrière limitant l'accès des machineries de réparation à l'ADN. Ainsi pendant la réparation des CDB, plusieurs voies de remodelage de la chromatine sont mises en place pour altérer la structure de la chromatine autour des CDB. Par exemple, des études biophysiques indiquent qu'il y a une expansion de la chromatine à proximité des CDB (Kruhlak *et al.*, 2006), ce qui est consistant avec une décondensation de la chromatine en réponse aux CDB. L'acétylation des histones est un modulateur bien connu de la structure chromatinienne et souvent permet de faciliter l'accessibilité de protéines à la chromatine.

- Recrutement du complexe TIP60 aux CDB

Une partie de l'acétylation des histones à proximité des CDB est due au complexe TIP60 (Bird *et al.*, 2002 ; Downs *et al.*, 2004 ; Kusch *et al.*, 2004 ; Murr *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2010). Chez les mammifères, Tip60, TRRAP et p400 (trois sous-unités du complexe TIP60) sont toutes les trois recrutées aux sites de cassure. Elles agissent toutes sur l'acétylation de la chromatine en périphérie d'une cassure, suggérant que le complexe TIP60 au complet est recruté à proximité d'une cassure (Murr *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2010). En effet, la déplétion de TRRAP conduit à la perte de Tip60 et à la perte de l'acétylation de l'histone H4 autour d'une cassure (Murr *et al.*, 2006). De plus, Xu *et al.* montrent que l'inactivation de l'activité ATPase de p400 ou de l'activité HAT de Tip60 entraîne également une diminution de l'acétylation de l'histone H4 aux abords d'une CDB (Xu *et al.*, 2010).

Chez la levure, le complexe NuA4 est également responsable de l'acétylation de l'histone H4 autour des CDB. Plusieurs expériences de ChIP ont mis en évidence le recrutement des sous-unités Arp4, Elp1, Eaf1 et Esa1 (respectivement, homologues des protéines humaines Baf53, Epc1, p400 et Tip60) du complexe NuA4 à une CDB *in vivo* (Downs *et al.*, 2004 ; Bird *et al.*, 2002). Bird *et al.*, montrent que Esa1 est essentielle pour l'acétylation de l'histone H4 aux CDB (Bird *et al.*, 2002).

Que ce soit chez la levure ou chez les mammifères, le recrutement du complexe TIP60/NuA4 est dépendant de l'histone γ -H2AX (Downs *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2010). Chez la levure, le recrutement de NuA4 aux CDB est associé à la sous-unité Arp4, puisque Arp4

reconnait spécifiquement γ -H2AX *in vitro* et est requise pour le recrutement du complexe NuA4 *in vivo* (Downs *et al.*, 2004). Chez les mammifères, l'implication de la sous-unité Baf53 (homologue de Arp4) n'a pas été testée, mais Murr *et al.* (2006) observe que le recrutement de TIP60 au CDB est dépendant de la sous-unité TRRAP (Murr *et al.*, 2006).

- TIP60 et l'acétylation de la chromatine

De récentes études tendent à montrer que l'activité HAT de TIP60 permet la décondensation de la chromatine en périphérie d'une CDB et promeut la réparation par recombinaison homologue.

Les interactions entre les histones et l'ADN sont très stables, et les histones ne peuvent être retirées de chromatine purifiée qu'à une concentration en NaCl supérieur à 1.5 M (Shechter *et al.*, 2007). Or Xu *et al.* montrent qu'après des dommages à l'ADN, une concentration saline de 1 M est suffisante pour éluer des histones de la chromatine, supportant l'idée que les dommages à l'ADN conduisent à la déstabilisation de la chromatine. Ils montrent alors que cette décondensation de la chromatine n'est plus observée lorsque le complexe TIP60 n'est plus fonctionnel, soit par l'inactivation de l'activité ATPase de p400, soit par l'inactivation de l'activité HAT de Tip60 (Xu *et al.*, 2010). Parce qu'ils observent un défaut de recrutement aux CDB des protéines de la réparation Brcal et 53BP1 suite à l'inactivation du complexe TIP60, ils proposent que la décondensation de l'ADN autour d'une cassure facilite le chargement des protéines de la réparation (Xu *et al.*, 2010).

En accord avec cette hypothèse, Murr *et al.*, (2006) observent également un défaut de recrutement des protéines Brcal, 53BP1 et Rad51 lorsque le complexe TIP60 est inactivé par la déplétion de sa sous-unité TRRAP (Murr *et al.*, 2006). De plus, l'ajout de chloroquine, de sodium butyrate ou mettre les cellules en condition hypotonique (trois moyens de décondenser la chromatine) restaurent le recrutement de Rad51 (Murr *et al.*, 2006).

Les protéines hPontin et hReptin ont également un rôle dans la décondensation de la chromatine en périphérie d'une CDB (Gospodinov *et al.*, 2009). Tout comme l'inactivation de hTIP60, la déplétion de hPontin ou hReptin entraîne un défaut de recrutement de hRad51 aux CDB qui peut également être restauré en présence de sodium butyrate (Gospodinov *et al.*,

2009). Etant donné que hPontin et hReptin sont nécessaires pour l'activité HAT du complexe hTIP60 (Jha *et al.*, 2008 ; Jha *et al.*, 2013), on peut supposer que la déplétion de hPontin ou hReptin inactive le complexe hTIP60 et donc empêche l'acétylation des histones dépendante de hTIP60 en réponse aux CDB.

Supportant cette idée, Tang *et al.* (2013) observent que la déplétion de hPontin ou hTip60 entraîne les mêmes défauts de recrutement des protéines 53BP1 et Rad51, défauts qui peuvent être restaurés par traitement des cellules à la trichostatin A (TSA), inhibiteur d'histones désacétylases (Tang *et al.*, 2013).

- *TIP60 dans l'atténuation du signal de la réparation γ -H2AX*

La phosphorylation de l'histone H2AX en réponse à une CDB est une étape clef de la réparation des CDB, jouant un rôle à la fois dans la signalisation et dans l'initiation des mécanismes de réparation. Cette phosphorylation crée un signal épigénétique spécifiquement reconnu par plusieurs protéines de la réparation et de la signalisation des points de contrôle (Yuan *et al.*, 2010). Ainsi, le retrait de la phosphorylation de l'histone H2AX est une étape nécessaire après la réparation afin de stopper le recrutement des protéines de la réparation mais également pour permettre aux cellules réparées de reprendre leur cycle cellulaire.

La façon dont γ H2AX est retirée de la chromatine n'est pas encore complètement résolue et plusieurs mécanismes ont été proposés pour le rétablissement de la chromatine. Le premier mécanisme implique la déphosphorylation de γ H2AX par des phosphatases (Chowdhury *et al.*, 2005 ; Nakada *et al.*, 2008). Le second mécanisme implique l'échange de l'histone γ H2AX par une histone H2AX non modifiée. Cet échange d'histone est dépendant du complexe TIP60 (Kusch *et al.*, 2004 ; Jha *et al.*, 2008).

Le complexe de drosophile TIP60 est co-purifié avec la forme phosphorylée de l'histone H2Av (H2AX chez la drosophile). dTIP60 acétyle l'histone H2Av dans un contexte de nucléosomes, avec une efficacité plus importante lorsque H2Av est d'abord phosphorylée (Kusch *et al.*, 2004). De plus, ce complexe catalyse de manière ATP-dépendant le remplacement, au sien d'un nucléosome, d'une histone γ -H2Av acétylée par une histone H2Av non modifiée (Kusch *et al.*, 2004). En accord avec ces données, un siARN contre la protéine dTip60 ou une mutation de la sous-unité Mrg15 du complexe dTIP60 conduit à une

persistance d'une forme phosphorylée de H2Av après induction de dommages à l'ADN (Kusch *et al.*, 2004).

Chez l'homme, le complexe TIP60 est également important pour le retrait de la marque épigénétique γ -H2AX (Jha *et al.*, 2008). En effet, la déplétion de hTRRAP ou de hTip60 entraîne, en plus de la diminution de l'acétylation de H4 dépendante de TIP60, l'augmentation de γ -H2AX après induction de dommage à l'ADN par traitement aux UV (Jha *et al.*, 2008 ; Murr *et al.*, 2006). L'acétylation de l'histone H4 est nécessaire pour le processus de retrait de γ -H2AX, puisque la surexpression d'une histone H4 ne pouvant plus être acétylée par Tip60 conduit également à l'augmentation de γ -H2AX après traitement aux UV (Jha *et al.*, 2008). hPontin a été proposée comme importante dans ce mécanisme puisqu'elle est essentielle à l'activité HAT du complexe TIP60 *in vitro* mais aussi parce que la déplétion de hPontin conduit également à l'augmentation de la forme phosphorylée de H2AX (Jha *et al.*, 2008).

Cette étude ne permet pas d'identifier quel est le mécanisme chez l'homme par lequel le signal γ -H2AX est retiré de la chromatine. Aucune étude n'a encore montré que le complexe humain TIP60 était capable d'échanger un dimère γ -H2AX-H2B contre un dimère H2AX-H2B. Par contre, Pontin et Reptin ou un complexe contenant p400 sont connus pour être capable d'incorporer un dimère H2A.Z-H2B dans un nucléosome par échange avec un dimère H2A-H2B *in vitro*, et *in vivo* (montré seulement pour p400). Elles sont donc de bon candidat pour être directement responsable de la suppression de γ -H2AX après acétylation de l'histone H4 par TIP60. Un autre candidat potentiel est le complexe FACT, facteur requis pour l'élongation de la transcription et facilitant le remodelage de la chromatine (Winkler et Luger, 2011). Ce complexe a récemment été montré comme capable d'échanger le variant d'histone H2AX au sein de nucléosomes reconstitués *in vitro* (Heo *et al.*, 2008). Il se révèle aussi être un bon candidat pour réaliser l'éviction de γ -H2AX une fois la réparation terminée.

Notons que chez l'homme, l'acétylation de la lysine 5 de l'histone H2AX par Tip60 est également nécessaire pour le retrait de l'histone H2AX de la chromatine suite à une CDB (Ikura *et al.*, 2007). Par contre, le mécanisme observé par Ikura *et al.* (2007) est indépendant de la phosphorylation d'H2AX, suggérant que ce mécanisme n'est pas représentatif du retrait du signal γ -H2AX. De plus, dans cette étude le retrait de H2AX est observé immédiatement après induction des dommages à l'ADN (Ikura *et al.*, 2007). Etant donné que γ -H2AX n'est

pas détecté dans les 1 à 2 kilobases entourant une CDB (Downs *et al.*, 2004 ; Shroff *et al.*, 2004), il est possible que le retrait de l'histone H2AX de la chromatine dépendant de l'acétylation de la lysine 5 soit impliqué dans le remaniement chromatinien au voisinage immédiat des CDB.

- *Tip60 et l'adaptation des points de contrôle en réponse aux CDB*

Comme mentionné précédemment, l'apparition de dommages sur l'ADN conduit à l'activation de voies de signalisation nommées points de contrôle qui permettent de bloquer la progression du cycle cellulaire afin de s'assurer que les dommages soient bien réparés avant que la cellule ne passe dans une nouvelle étape de son cycle. Parmi les voies de signalisation des points de contrôle, on distingue une voie rapide (ATM-Chk2-Cdc25a) et une voie lente (ATM-Chk2-p53).

Pour la voie ATM-Chk2-Cdc25a, ATM est activée suite à une CDB et va alors phosphoryler de nombreuses protéines dont Chk2 (pour « Checkpoint Kinase 2 »). La phosphorylation de Chk2 entraîne son homo-dimérisation lui permettant à son tour de phosphoryler la phosphatase Cdc25a ce qui conduit cette dernière à sa dégradation. La dégradation de Cdc25a bloque la déphosphorylation de la kinase cycline dépendante CDK2. CDK2 phosphorylée ne peut plus s'associer avec la cycline E, association nécessaire pour l'entrée en phase S.

La seconde voie est dépendante de phosphorylations médiées par ATM et Chk2 sur la protéine suppresseur de tumeur p53 et sur des régulateurs négatifs de p53. Ces phosphorylations conduisent à la stabilisation de p53 et à son accumulation nucléaire. p53 peut alors activer de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la senescence tel que l'inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines, p21 ou encore les gènes pro-apoptotiques *BAX* et *PUMA*.

Parce que Tip60 joue un rôle dans l'activation d'ATM, il est clair que cette HAT est impliquée en amont de ces deux voies de signalisation. Sun *et al.* (2005) montrent que suite au traitement de cellules à la bléomycine (peptide glycosylé causant des cassures d'ADN) la phosphorylation d'ATM, Chk2 et de p53 est grandement diminuée dans des cellules déplétées pour Tip60 comparé aux cellules sauvages (Sun *et al.*, 2005).

Tip60 a également un rôle plus spécifique dans la voie ATM-Chk2-p53. p53 est une cible directe de Tip60. hTip60 acétyle spécifiquement p53 sur la lysine 120 en réponse aux dommages à l'ADN (Sykes *et al.*, 2006 ; Tang *et al.*, 2006). Cette acétylation oriente p53 vers l'induction de gènes pro-apoptotiques. En effet, la mutation de la lysine 120 de p53 ne lui permettant plus d'être acétylée ou la déplétion de hTip60 entraîne la diminution de l'expression des gènes *BAX* et *PUMA*, sans affecter l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire tel que p21 (Sykes *et al.*, 2006 ; Tang *et al.*, 2006).

Ces résultats laissaient entrevoir la possibilité que Tip60 permettait le contrôle de p53 pour promouvoir exclusivement l'orientation de cellules présentant des dommages à l'ADN vers l'apoptose. Toutefois, p21 a récemment été identifiée comme une cible directe de Tip60 en réponse aux dommages à l'ADN (Lee *et al.*, 2013). L'acétylation de p21 par Tip60 en réponse à des stress génotoxiques est essentielle pour bloquer les cellules en phase G1 (Lee *et al.*, 2013). Tip60 semble donc être un stimulateur général de la signalisation des points de contrôle en activant les protéines en amont (ATM) et en aval (p53 et p21) de ces voies (**Figure 9**).

2) Le complexe TIP60/NuA4 dans la régulation de la transcription

Les nucléosomes inhibent l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase en empêchant l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription sur le promoteur. Les activateurs transcriptionnels se fixent sur les régions promotrices et recrutent des complexes de remodelage de la chromatine pour déplacer ou supprimer les nucléosomes de ces régions dans le but de stimuler l'assemblage du complexe de pré-initiation. Outre le remodelage ATP-dépendant des nucléosomes, la neutralisation des charges positives des résidus lysines par leurs acétylations diminue l'interaction des histones pour l'ADN. De plus, l'acétylation en elle-même constitue un site de reconnaissance pour les sous-unités de complexes de remodelage possédant un bromodomaine. Ainsi, les complexes HAT stimulent le déplacement des nucléosomes par les complexes de remodelage *in vitro*, ce qui peut expliquer leur rôle dans l'éviction des histones des promoteurs et des régions codantes *in vivo* (Li *et al.*, 2007 ; Shahbazian et Grunstein, 2007).

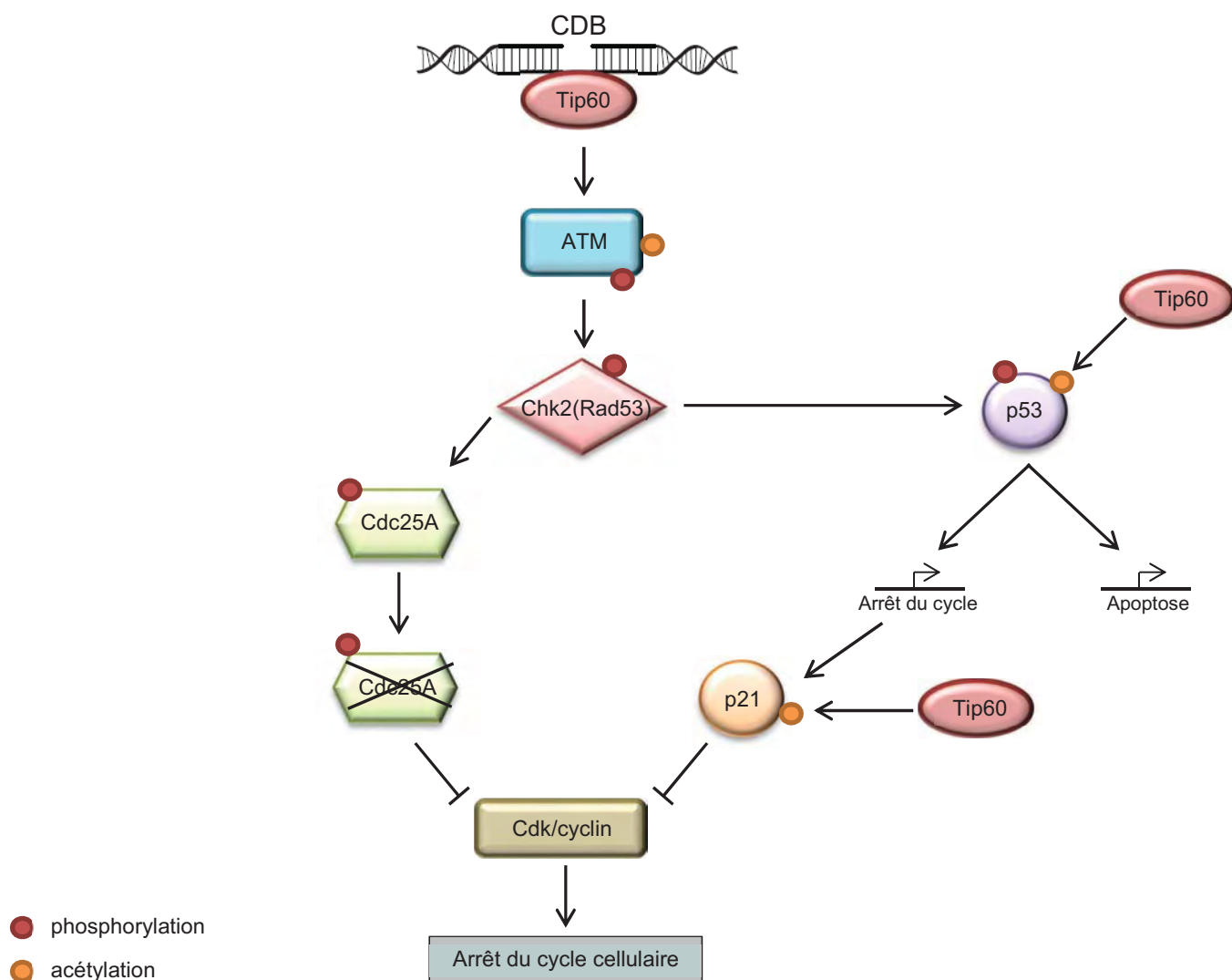


Figure 9. Tip60 dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire suite à une cassure double brin. L'activation d'ATM conduit à la phosphorylation de Chk2. La phosphorylation de Chk2 conduit à l'arrêt du cycle par une voie rapide, en inhibant les phosphatases Cdc25, ou par une voie lente, en orientant p53 vers ses cibles transcriptionnelles permettant l'arrêt du cycle cellulaire par p21, ou l'apoptose, par *bax* et *puma*. Par son rôle dans l'activation d'ATM, Tip60 participe au contrôle de ces deux voies. De plus, Tip60 acétyle p53 ce qui augmente la transcription des gènes pro-apoptotiques médiée par p53. L'activité de p21 est également dépendante de son acétylation par Tip60.

a) NuA4 et la transcription

Chez la levure, TIP60/NuA4 est responsable de la plupart des acétylations des histones H4 et H2A *in vivo* (Doyon et Côté, 2004). Esa1 (l'homologue de Tip60) est la seule acétyltransférase de lysine essentielle chez la levure, et affecte largement l'expression de nombreux gènes (Biswas *et al.*, 2008 ; Durant et Pugh, 2007 ; Galarneau *et al.*, 2000 ; Geng et Laurent, 2004 ; Morillon *et al.*, 2005 ; Reid *et al.*, 2000). Esa1 est également retrouvée dans un sous complexe nommé PicNuA4, lequel ne contient que deux sous-unités en plus de Esa1, Epl1 et Yng2 (Doyon et Côté, 2004).

Les études de ChIP révèlent qu'Esa1 occupe les promoteurs de nombreux gènes à un degré corrélé avec le niveau de transcription de ces gènes (Robert *et al.*, 2004). *In vivo*, Esa1 peut être recrutée par divers activateurs transcriptionnels (Geng et Laurent, 2004 ; Morillon *et al.*, 2005 ; Reid *et al.*, 2000 ; Robert *et al.*, 2004). Nous ne savons pas encore si la présence de Esa1 sur les promoteurs reflète un recrutement de NuA4 ou de PicNuA4. Parce que NuA4 diffère de PicNuA4 dans son habilité à interagir intimement avec des activateurs transcriptionnels (Boudreault *et al.*, 2003) et parce qu'il peut être recruté sur un modèle chromatinien *in vitro* (Utley *et al.*, 1998), il est proposé que NuA4 permet l'acétylation ciblée des histones H4 et H2A sur les promoteurs, tandis que PicNuA4 catalyse le maintien global de l'acétylation du génome.

Le rôle de NuA4 (ou PiccoloNuA4) et bien entendu l'acétylation des histones H2A et H4 mais également de l'histone Htz1 (Babiarz *et al.*, 2006 ; Ishibashi *et al.*, 2009 ; Keogh *et al.*, 2006 ; Millar *et al.*, 2006). Ces acétylations permettent la déstabilisation des nucléosomes aux promoteurs. Elles forment également des signaux pour le recrutement de remodeleurs de la chromatine à bromodomaine RSC et SWI/SNF ou FACT permettant la décondensation de la chromatine afin de promouvoir la transcription (Durant et Pugh, 2007 ; Ginsburg *et al.*, 2009 ; Nourani *et al.*, 2001 ; Nourani *et al.*, 2004 ; Reid *et al.*, 2000 ; Utley *et al.*, 1998 ; Vignali *et al.*, 2000). L'acétylation des histones par NuA4 faciliterait également l'incorporation de Htz1 aux promoteurs, stabilisant SWR1 sur les nucléosomes par l'interaction entre H4 acétylée et la sous-unité à bromodomains, Bdf1 de SWR1 (Altaf *et al.*, 2010 ; Ranjan *et al.*, 2013).

Les nucléosomes sont aussi des barrières pour l'élongation de l'ARN polymérase II. Pour faciliter le passage de l'ARN polymérase, les histones sont expulsées des régions codantes d'une manière directement corrélée avec le taux de transcription (Schwabish et Struhl, 2004 ; Williams et Tyler, 2007).

Une étude montre que l'acétylation des H4 dans la région codante par le complexe NuA4 facilite l'élongation de l'ARN polymérase II *in vivo* (Ginsburg *et al.*, 2009). NuA4 est recruté co-transcriptionnellement sur les régions codantes de certains gènes dans un mécanisme impliquant la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II ainsi que la méthylation des histones H3 dans la région codante. Tout comme pour l'initiation de la transcription, l'acétylation des histones dans la région codante des gènes par NuA4 permet le recrutement des complexes RSC et SWI/SNF par leur bromodomaine, facilitant la déstabilisation des histones afin d'aider le passage de l'ARN polymérase II (Ginsburg *et al.*, 2009).

b) Le complexe TIP60 et la régulation de la transcription

Chez les eucaryotes supérieurs, le complexe TIP60 a été identifié comme co-activateur (Bauer *et al.*, 2000 ; Gaughan *et al.*, 2001 ; Patel *et al.*, 2004 ; Taubert *et al.*, 2004) mais aussi comme co-répresseur (Ai *et al.*, 2007 ; Gupta *et al.*, 2012 ; Jha *et al.*, 2010 ; Xiao *et al.*, 2003) de nombreux gènes (Fazzio *et al.*, 2008 ; Schirling *et al.*, 2010). Comme chez la levure, l'acétylation des histones H2A et H4 par TIP60 fait de la chromatine un environnement favorable à la transcription. Par contre, lorsque le complexe TIP60 est impliqué dans la répression transcriptionnelle, ces acétylations peuvent être reconnues par des complexes répresseurs (Gupta *et al.*, 2012 ; Jha *et al.*, 2010). La fonction répressive de TIP60 est dans certains cas indépendante de son activité HAT et pourrait être provoquée par son interaction avec des histones désacétylases (Ai *et al.*, 2007 ; Schirling *et al.*, 2010 ; Xiao *et al.*, 2003). Par sa sous-unité p400 (domino chez la drosophile), le complexe TIP60 est également impliqué dans la déposition d'H2A.Z (H2Av chez la drosophile) aux promoteurs de certains gènes contribuant à leur régulation positive (Couture *et al.*, 2012 ; Gévry *et al.*, 2009) ou négative (Gévry *et al.*, 2007). Enfin, Tip60 a également pour cible d'acétylation des facteurs de transcription comme p53 (Legube *et al.*, 2004 ; Sykes *et al.*, 2006 ; Tang *et al.*, 2006) ou encore le Récepteur Androgène (AR pour « Androgen Receptor ») (Gaughan *et al.*, 2002). Cette acétylation permet d'orienter les facteurs de transcription vers certains de leurs gènes

cibles. Par exemple, l'acétylation de p53 l'oriente vers l'activation des gènes pro-apoptotiques plutôt que vers l'arrêt du cycle cellulaire.

Bien que les protéines Pontin et Reptin fassent partie intégrante du complexe TIP60, leur rôle dans la régulation transcriptionnelle par l'acétylation de facteurs de transcription médiée par TIP60 n'a jamais été étudié. Par contre, étant donné que les protéines Pontin et Reptin sont essentielles pour l'activité HAT de TIP60 (Jha *et al.*, 2008 ; Jha *et al.*, 2013), nous pouvons spéculer qu'elles peuvent être importantes pour moduler le niveau d'acétylation des promoteurs cibles de TIP60. D'ailleurs, nous verrons dans la suite de ce manuscrit que Pontin et Reptin ont été trouvées avec d'autres sous-unités du complexe TIP60 sur plusieurs promoteurs (Feng *et al.*, 2003 ; Frank *et al.*, 2003 ; Taubert *et al.*, 2004). Une de ces études démontre que la protéine Pontin est nécessaire pour l'acétylation d'H4 sur l'un de ces promoteurs et pour l'expression subséquente de ce gène (Feng *et al.*, 2003).

II) Pontin et Reptin associées à des facteurs de transcription

Comme mentionné précédemment, la protéine Pontin a été initialement identifiée après une purification par affinité dans un extrait nucléaire de foie de rat comme un partenaire de la protéine TATA-box Binding Protein (TBP) (Kanemaki *et al.*, 1997). L'interaction directe entre les protéines Pontin, Reptin et la TBP a été confirmée peu de temps après chez la drosophile, la levure et l'homme (Bauer *et al.*, 1998 ; Makino *et al.*, 1998 ; Ohdate *et al.*, 2003). Plusieurs études ont impliqué les protéines Pontin et Reptin dans la régulation transcriptionnelle et ce, indépendamment de leur implication dans les complexes de remodelage de la chromatine. Il a été démontré que pour des mutants conditionnels des gènes codants pour yPontin et yReptin, plus de 5% des gènes de la levure sont dérégulés (Jónsson *et al.*, 2001). Beaucoup des gènes régulés par Pontin et Reptin sont directement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Jónsson *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2000).

En plus de la TBP, les protéines Pontin et Reptin interagissent avec plusieurs facteurs de transcription, tels que c-Myc (Bellosta *et al.*, 2005 ; Etard *et al.*, 2005 ; Frank *et al.*, 2003 ; Koch *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2010 ; Wood *et al.*, 2000), β -caténine (Bauer *et al.*, 1998 ; Bauer *et al.*, 2000 ; Etard *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2006), ATF2 (Cho *et al.*, 2001) ou encore E2F (Dugan *et al.*, 2002 ; Taubert *et al.*, 2004). Lorsque cela a été étudié, les protéines Pontin et Reptin sont retrouvées sur les promoteurs des gènes cibles de ces facteurs de transcription

comme pour c-Myc (Frank *et al.*, 2003), E2F1 (Taubert *et al.*, 2004), β -caténine (Kim *et al.*, 2005) ou encore NF- κ B (Kim *et al.*, 2005), impliquant directement les protéines Pontin et Reptin dans le processus même de la transcription.

A) Interaction avec c-Myc

c-Myc est un facteur oncogénique comportant un domaine de régulation transcriptionnelle à son extrémité N-terminale et un domaine de fixation à l'ADN à son extrémité C-terminale. Le domaine de régulation transcriptionnelle contient deux domaines conservés : la boîte Myc I (MbI) et la boîte Myc II (MbII). MbII est essentielle pour la transformation oncogénique médiée par c-Myc. c-Myc se dimérise avec la protéine Max ce qui lui permet de se fixer sur les promoteurs et d'induire ou réprimer l'expression des gènes. Un des mécanismes de répression concerne le facteur de transcription Miz1. Lorsque Miz1 est complexé à c-Myc, les gènes cible de Miz1 sont réprimés (pour revue : Dang, 2012). Les protéines Pontin et Reptin ont été montrées comme partenaires nécessaires aux activités transcriptionnelles de c-Myc chez les mammifères, la drosophile et le xénope (Bellosta *et al.*, 2005 ; Dugan *et al.*, 2002 ; Etard *et al.*, 2005 ; Wood *et al.*, 2000).

1) Pontin et Reptin dans la transformation médiée par c-Myc

La purification par affinité de protéines nucléaires de cellules de mammifères interagissant avec c-Myc révèle hPontin et hReptin. Plus précisément, l'interaction c-Myc, Pontin et Reptin est portée par le domaine MbII nécessaire à l'activité oncogénique de c-Myc et par le domaine DII des protéines Pontin et Reptin (Wood *et al.*, 2000). L'implication de cette interaction dans la transformation cellulaire médiée par c-Myc a été testée dans un système permettant de visualiser la transformation oncogénique dépendante de c-Myc. La co-transfection de H-RasG12V et c-Myc conduit à la formation de foyers de cellules transformées qui sont strictement dépendants de l'activité transcriptionnelle de c-Myc. Pontin sauvage ou un mutant du Walker B (D302N) sont co-transfectés avec c-Myc et H-RasG12V dans des fibroblastes embryonnaires de rat. Alors que la surexpression de la forme sauvage de Pontin n'a aucun effet, la forme mutée sur le Walker B inhibe la transformation cellulaire médiée par c-Myc (Wood *et al.*, 2000), suggérant que l'activité ATPase a un rôle essentiel dans leur fonction avec c-Myc.

2) D'une manière générale, Pontin et Reptin favorisent l'activité oncogénique de c-Myc

Au-delà de la preuve formelle de la coopération des protéines Pontin, Reptin et c-Myc dans la transformation cellulaire (Wood *et al.*, 2000), Pontin et Reptin ont été décrites à plusieurs reprises comme favorisant l'activité oncogénique de c-Myc souvent comme corépresseurs de c-Myc (Bellosta *et al.*, 2005 ; Etard *et al.*, 2005 ; Koch *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2010 ; Wood *et al.*, 2000). L'interaction de dPontin et dReptin sur le MbII de dMyc est conservée chez la drosophile. Un complexe ternaire comprenant dMyc, dPontin et dReptin a pu être isolé *in vivo* (Bellosta *et al.*, 2005). Par immuno-précipitation de chromatine, les auteurs montrent que le gène *MFAS* (impliqué dans l'adhésion cellulaire) est réprimé par dMyc et dPontin (Bellosta *et al.*, 2005). Etant donnée la forte interaction génétique entre dPontin et dMyc sur le contrôle de la croissance cellulaire et de la prolifération chez la drosophile, les auteurs proposent qu'un complexe dMyc, dPontin et probablement dReptin peut contrôler l'expression de plusieurs gènes dépendants de dMyc (Bellosta *et al.*, 2005).

Chez le xénope, la déplétion de xPontin ou xReptin est létale au stade embryonnaire (Etard *et al.*, 2005). Par contre, des embryons de xénope déplétés pour xPontin ou xReptin peuvent être sauvés par la surexpression de c-Myc ou l'inhibition de Miz1 (Etard *et al.*, 2005). Ceci nous indique que les protéines Pontin, Reptin, c-Myc et Miz1 peuvent agir au sein d'une même voie de signalisation. De plus, la surexpression de xPontin ou xReptin, mais pas d'un mutant qui ne lie pas c-Myc, augmente l'effet répressif de c-Myc sur p21, un gène cible de Miz1, et donc accélère la division cellulaire (Etard *et al.*, 2005) (**Figure 10A**).

Récemment, une coopération entre c-Myc, Max, Miz1, Pontin et Reptin a été rapportée sur une autre cible de c-Myc, le gène suppresseur de tumeur C/EBP δ (Si *et al.*, 2010). L'expression de C/EBP δ est corrélée à l'arrêt du cycle cellulaire tandis que sa répression est corrélée à la prolifération cellulaire (pour revue Johnson *et al.*, 2005). Par immuno-précipitation de chromatine, Si *et al.* montrent que dans des cellules mammaires épithéliales non-transformées de souris, donc lorsque C/EBP δ est exprimé, les protéines Miz1 et Max sont constitutivement associées au promoteur de C/EBP δ , en l'absence de c-Myc. Par contre dans des cellules en croissance (C/EBP δ est réprimé) c-Myc viendrait s'associer à Miz1 et Max pour réprimer C/EBP δ (Si *et al.*, 2010). Parce que le domaine MbII est essentiel à la répression de C/EBP δ et parce que la surexpression de mPontin et/ou de mReptin conduit

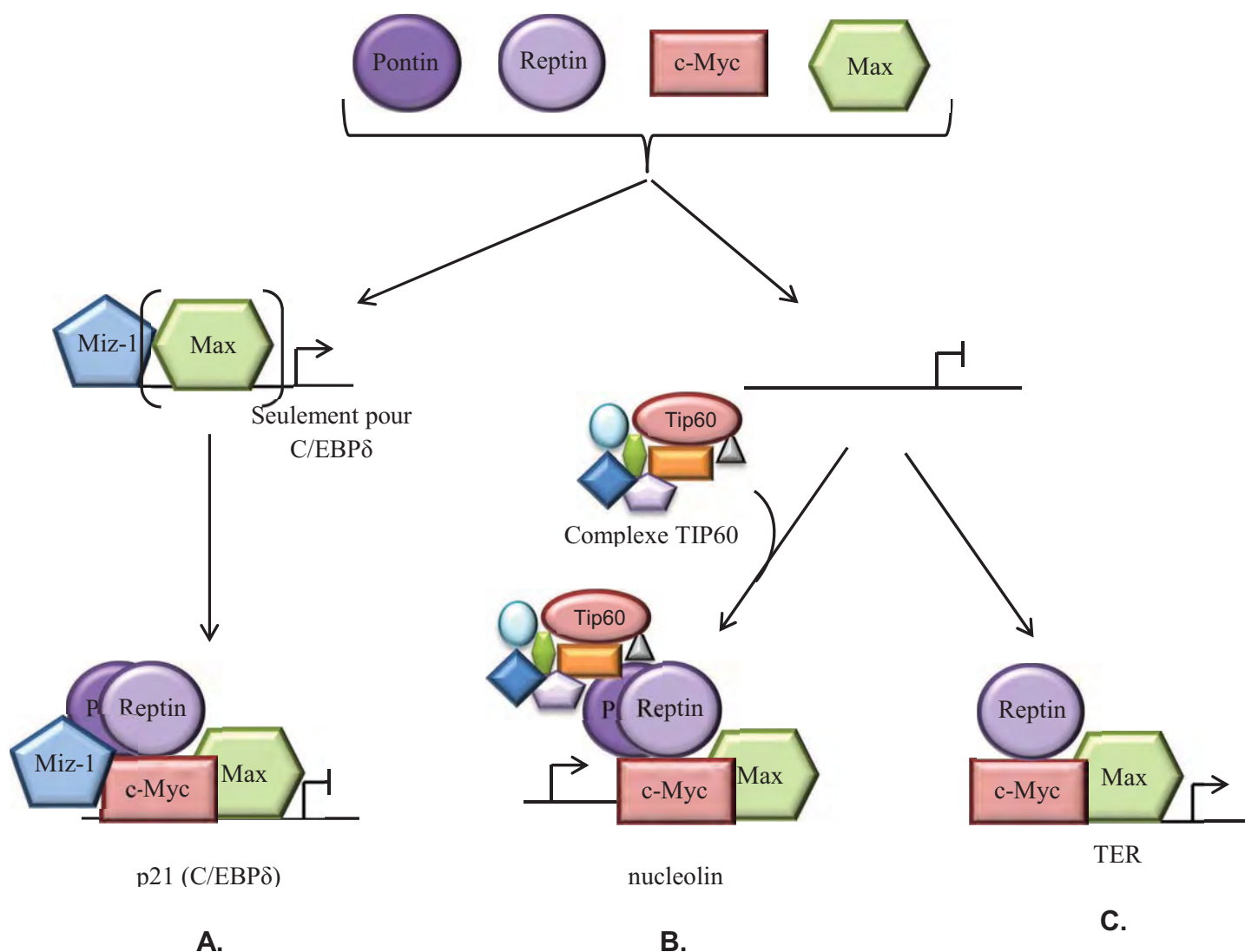


Figure 10. Différentes interactions entre Pontin, Reptin et c-Myc. Pontin et Reptin interagissent avec c-Myc et sont retrouvées à la fois comme co-activateur ou co-represseur de gènes cibles de c-Myc. **A.** Pontin et Reptin interagissent avec c-Myc/Max/Miz-1 pour réprimer p21 et C/EBPδ. **B.** Pontin et Reptin, au sein du complexe TIP60, interagissent avec c-Myc/Max pour permettre l'expression de la nucleolin. Il est difficile de dire si c-Myc/Max recrute le complexe TIP60, dont Pontin et Reptin, sur sa séquence cible, ou si un complexe Pontin/Reptin/c-Myc/Max permet l'assemblage du complexe TIP60 par l'intermédiaire de Pontin et Reptin. **C.** Reptin interagit avec c-Myc/Max pour permettre l'expression de TERT.

Parce que la dimérisation de c-Myc avec MAX est essentielle pour les activités transcriptionnelles de c-Myc, Max est toujours représenté dans cette figure même lorsque sa présence n'a pas été étudiée.

à la répression de C/EBP δ , les auteurs proposent que la répression de C/EBP δ passe par un complexe multiprotéique contenant c-Myc, Pontin, Reptin, Max et Miz1 (Si *et al.*, 2010) (**Figure 10A**).

Le mécanisme par lequel Pontin et Reptin participe à la régulation transcriptionnelle avec c-Myc n'est pas connu. Jusqu'ici, tous les exemples présentés impliquent les protéines Pontin et Reptin comme corépresseurs de c-Myc, probablement dans un complexe comprenant c-Myc, Pontin, Reptin, Max et Miz1. Cependant, ceci ne semble pas être un mécanisme général de la participation des protéines Pontin et Reptin avec c-Myc, puisque les protéines Pontin et Reptin ont également été associées à l'activation transcriptionnelle dépendante de c-Myc. Par exemple, Frank *et al.* (2003) démontrent que le complexe TIP60, dont Pontin et Reptin, est recruté par c-Myc sur le gène *NUCLEOLIN* dont l'acétylation d'H4 et l'activation de la transcription dépend de c-Myc. Par contre, ce travail n'a pas évalué dans quelles mesures les protéines Pontin et Reptin participent à cette activation de la transcription par c-Myc. On peut toutefois supposer qu'elles doivent être nécessaires pour l'activité HAT de TIP60 (**Figure 10B**). Récemment, l'étude de l'expression du gène hTERT (télomérase reverse transcriptase) dans des lignées cancéreuses montre que hReptin est requise pour le recrutement de c-Myc au promoteur de hTERT, concomitant à l'activation de son expression (Li *et al.*, 2010) (**Figure 10C**).

B) Interaction avec E2F1

Comme c-Myc, la protéine E1A d'adénovirus est capable de transformer des cellules, d'induire ou de stopper la prolifération et d'induire l'apoptose. E1A ne se fixe pas sur la chromatine mais il module ou empêche le recrutement de co-facteurs par les facteurs de transcription de la famille E2F. La cible majeure de E1A pour son activité oncogénique est le facteur de transcription E2F1 (pour revue Berk, 2005).

Les protéines hPontin et hReptin interagissent avec E2F1 sous la dépendance de son domaine transactivateur (Dugan *et al.*, 2002). Le peu de données accumulées sur le mécanisme par lequel les protéines Pontin et Reptin participent à l'activation transcriptionnelle médiée par E2F1 est similaire à celui observé pour l'activation des cibles de c-Myc. A l'image de ce que l'on observe pour c-Myc, la transformation cellulaire médiée par E1A est dépendante des protéines rPontin et rReptin (Dugan *et al.*, 2002). En effet, rPontin

sauvage ou un mutant du Walker B (D302N) sont co-transfectés avec E1A et H-RasG12V dans des fibroblastes embryonnaires de rat. Alors que la surexpression de la forme sauvage de Pontin n'a aucun effet, la forme mutée sur le Walker B inhibe la transformation cellulaire médiée par E1A (Dugan *et al.*, 2002). Ce mécanisme passe donc probablement par un complexe contenant au moins Pontin, Reptin et E2F1 ou l'activité ATPase des protéines Pontin et Reptin doit avoir un rôle essentiel dans leur fonction avec E2F1.

Comme observé suite à l'activation du gène *NUCLEOLIN* par c-Myc (Frank *et al.*, 2003), l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de E2F1 conduit au recrutement de TIP60, dont Pontin et Reptin (Taubert *et al.*, 2004).

C) Interaction avec β -caténine

La voie de signalisation Wg/Wnt "wingless" identifiée chez la drosophile, le nématode et les vertébrés est activée par la liaison du ligant Wg/Wnt aux récepteurs cellulaires Frizzled. Cette fixation se traduit par une signalisation en cascade qui conduit à la déphosphorylation de β -caténine, une sous-unité centrale de la signalisation wingless. La forme déphosphorylée est guidée à l'intérieur du noyau pour former un complexe avec un membre de la famille LEF-1/TCF (« Lymphoid-Enhancing Factor-1/T Cell Factor »), qui contrôle la transcription de nombreux gènes (pour revue Cadigan, 2012).

1) Pontin et Reptin dans la transformation médiée par β -caténine

Bauer *et al.* montrent une interaction directe entre β -caténine et les protéines hPontin et hReptin (Bauer *et al.*, 1998 ; Bauer *et al.*, 2000). L'implication des protéines Pontin et Reptin comme cofacteurs de β -caténine a été étudié dans un système modèle (Feng *et al.*, 2003). Dans des cellules RK3E, lignée cellulaire correspondant à un épithélium de rat immortalisé par E1A d'adénovirus, la transfection d'un mutant oncogénique de β -caténine (ne pouvant plus être phosphorylé) entraîne l'apparition de foyers cellulaires caractérisant la transformation néoplasique médiée par β -caténine (Kolligs *et al.*, 1999). La lignée cellulaire RK3E a été co-transfectée avec la forme oncogénique de β -caténine et avec la forme sauvage de rPontin ou avec la forme mutée sur le Walker B (D302N) (Feng *et al.*, 2003). Le mutant oncogénique de β -caténine produit 70% à 80% moins de foyers cellulaires lorsqu'il est co-transfecté avec la forme mutée de rPontin comparé à sa transfection seule ou avec la forme

sauvage de rPontin (Feng *et al.*, 2003). Les gènes cibles de β -caténine, tels que *ITF-2* et *AXIL*, sont réprimés par la forme mutée de rPontin. La répression des gènes *ITF-2* et *AXIL* est également obtenue lorsque rPontin est déplétée par siARN. De plus, des expériences de ChIP démontrent que des sous-unités du complexe TIP60, Tip60, Pontin et TRRAP, sont présentes au niveau du site de fixation du facteur de transcription TCF-4 sur le promoteur du gène *ITF-2*. Les auteurs montrent que le niveau d'acétylation de H4 aux promoteurs des gènes cibles de β -caténine est diminué en présence d'une forme mutée du Walker B de rPontin (Feng *et al.*, 2003). Ces expériences semblent indiquer que β -caténine recrute Pontin aux promoteurs cibles de TCF dans le but de promouvoir l'acétylation de la chromatine.

2) Un rôle antagoniste des protéines Pontin et Reptin

L'implication de Reptin n'a pas été envisagée dans les expériences de Feng *et al.* (2003) mais il est probable que l'effet obtenu aurait été totalement opposé. En effet, les expériences sur des gènes rapporteurs de la voie de signalisation β -caténine montrent que Pontin et Reptin agissent de façon antagoniste pour cette voie de signalisation (Bauer *et al.*, 2000 ; Rashid *et al.*, 2009 ; Rottbauer *et al.*, 2002 ; Weiske et Huber, 2005). Pontin promeut l'expression des gènes cibles de TCF tandis que Reptin les réprime. Cet effet antagoniste des protéines Pontin et Reptin sur la voie de signalisation wingless a été confirmé *in vivo* par les données génétiques obtenues chez la drosophile (Bauer *et al.*, 2000). Par ailleurs, ce résultat corrèle avec l'effet antagoniste décrit pour les protéines zPontin et zReptin sur la croissance cardiaque chez le poisson zèbre (Rottbauer *et al.*, 2002).

3) Les protéines Pontin et Reptin au sein de complexes différents

Ces études sur la voie de signalisation wingless conduisent à penser que les protéines Pontin et Reptin agissent au sein de complexes différents. Une étude réalisée sur le développement de l'hypophyse chez la souris, suggère que Reptin agit au sein d'un complexe avec le co-répresseur TLE1 (Groucho chez la drosophile) et les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 (Olson *et al.*, 2006). En effet, ces quatre dernières protéines co-localisent sur le promoteur des gènes *HEX1* et *PIT1* lorsque leur expression est mise sous silence lors du développement (Olson *et al.*, 2006). Le rôle éventuel de Pontin et d'autres protéines du complexe TIP60 ainsi que la pertinence fonctionnelle de la présence des protéines HDAC, n'ont pas été entrepris dans cette analyse.

Ces derniers points ont été étudiés dans une analyse de la régulation du gène suppresseur de tumeur *KAI1* permettant de mettre en évidence une association mutuellement exclusive des protéines Pontin et Reptin au promoteur de ce gène (Kim *et al.*, 2005). Dans des cellules normales mais aussi dans des cellules transformées non-métastatiques, l'expression de *KAI1* est induite par l'interleukine IL-1 β (Kim *et al.*, 2005). Au contraire, des cellules transformées métastatiques ne répondent plus à l'IL-1 β . Cette différence s'accompagne du recrutement de différents cofacteurs sur le promoteur de *KAI1*. Dans des cellules non-induites, NF- κ B est lié au promoteur avec les co-répresseurs N-COR, TAB2 et l'histone déacétylase HDAC3 (Baek *et al.*, 2002). Dans des cellules non-métastatiques, un traitement à l'IL-1 β cible la perte de ces cofacteurs qui sont remplacés par Pontin et Tip60, induisant une acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur. De manière surprenante, alors que Tip60 est requise pour l'acétylation et l'induction subséquente de l'expression de *KAI1*, Pontin n'est pas requise dans ce processus. Dans des cellules métastatiques, les protéines Tip60 et Pontin sont remplacées par β -caténine, Reptin et HDAC1 ce qui a pour effet de maintenir le promoteur de *KAI1* à l'état réprimé. Les trois facteurs protéiques Reptin, β -caténine et HDAC1 sont nécessaires pour maintenir le promoteur à l'état inactif (Kim *et al.*, 2005).

Indépendamment de la β -caténine, les protéines Pontin et Reptin ne sont pas toujours associées ensemble au sein d'un même complexe (Cho *et al.*, 2001 ; Diop *et al.*, 2008). Chez la drosophile, la protéine Pontin a été identifiée comme sous-unité du complexe Brahma (BAF chez les mammifères et Swi-Snf chez la Levure) mais sans la protéine Reptin. La protéine Reptin, sans la protéine Pontin, fait partie du complexe de remodelage de la chromatine Polycomb repressive 1 (PRC1) (Diop *et al.*, 2008). Ces deux complexes sont cruciaux pour la différenciation cellulaire et l'organogenèse chez la drosophile (Tamkun, 1995). Pontin et Reptin au sein de ces complexes fonctionnent de façon antagoniste dans la régulation des gènes homéotiques *HOX* chez la drosophile (Diop *et al.*, 2008).

Reptin a également été identifiée sans Pontin dans la régulation de ATF2 (Cho *et al.*, 2001). ATF2 fait partie du complexe AP-1 (« Activator Protein 1 ») dont les membres sont activés par phosphorylation suite à un stress comme une exposition aux UV, des conditions hypoxiques ou encore des dommages à l'ADN (Gozdecka et Breitwieser, 2012). Une fois activés les AP-1 vont transloquer dans le noyau pour réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire, la transformation, la progression du

cycle cellulaire et la différenciation (Gozdecka et Breitwieser, 2012). Reptin interagit avec ATF2 seulement lorsque cette dernière est phosphorylée ce qui se traduit par la répression de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription ATF2 (Cho *et al.*, 2001).

4) Moduler la fonction transcriptionnelle des protéines Pontin et Reptin

Comme pour tous les processus impliquant les protéines Pontin et Reptin, nous ne savons pas de quelles façons elles agissent exactement sur l'expression des gènes cibles de TCF. Néanmoins, nous connaissons quelques régulateurs qui agissent directement sur les protéines Pontin et Reptin pour moduler leur effet sur l'expression.

Rashid et ses collaborateurs montrent que les protéines endosomales APPL1 et 2 ont un effet stimulateur sur l'expression des gènes cibles de TCF lorsque la voie wingless est activée (Rashid *et al.*, 2009). Cet effet stimulateur des protéines APPL est le résultat d'une interaction directe entre ces protéines et Reptin, ayant pour effet de moduler l'interaction Reptin- β -caténine et donc lève la répression de Reptin sur les cibles de TCF (Rashid *et al.*, 2009).

Hint1, une protéine encore peu connue mais ayant probablement un rôle comme suppresseur de tumeur (Genovese *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2006), interagit également avec Pontin et Reptin et cette interaction a été localisée sur le domaine DII pour Pontin et Reptin (Weiske et Huber, 2005). Par contre, contrairement aux protéines APPL, Hint1 réprime les gènes cibles de TCF normalement activés par β -caténine (Weiske et Huber, 2005). Il semble que Hint1 agissent sur l'état oligomérique des protéines Pontin et Reptin. En effet, par co-immunoprécipitation avec des protéines purifiées de Pontin et/ou Reptin, les auteurs observent que Hint1 inhibe l'interaction entre Pontin et Reptin et également, inhibe les interactions homomériques de Reptin et de Pontin, suggérant que Hint1 peut bloquer l'oligomérisation des protéines Pontin et Reptin (Weiske et Huber, 2005). De façon intéressante, l'effet de Hint1 ne semble pas perturber l'interaction entre β -caténine et Pontin ou Reptin (Weiske et Huber, 2005), laissant entrevoir l'idée que le rôle des protéines Pontin et Reptin dans la régulation transcriptionnelle de β -caténine puisse être contrôlé par leur état oligomérique.

5) Des modifications post-traductionnelles comme régulateurs de la fonction des protéines Pontin et Reptin

Les études de l'équipe de Baek sur la régulation de l'expression du gène *KAIL* apportent de nouveaux éléments sur des modulateurs de la fonction transcriptionnelle des protéines Pontin et Reptin. Dans les cellules métastatiques, une fraction de la protéine Reptin porte un groupement SUMO sur la lysine 456 essentiel à la répression du gène *KAIL* (Kim *et al.*, 2006). Cette sumoylation renforce la fonction co-répressive de Reptin avec β -caténine sur le gène *KAIL* (Kim *et al.*, 2006). Cette augmentation de l'effet répressif de Reptin est probablement une conséquence de l'interaction de Reptin avec HDAC1. En effet, l'affinité de Reptin pour HDAC1 est plus importante sous sa forme sumoylée. De plus, un mutant non-sumoylable de Reptin recrute Tip60 et active l'expression de *KAIL* (Kim *et al.*, 2006).

Peu après cette découverte, ce même groupe rapporte que Pontin peut également être sumoylée sur la lysine 255 et que cette sumoylation est essentielle à la fonction activatrice de la transcription de Pontin pour les gènes cibles de AR (« Androgen Receptor ») dans des cellules cancéreuses de prostate (Kim *et al.*, 2007). Notons que, la sumoylation des protéines Pontin et Reptin a également été identifiée dans une étude protéomique s'intéressant à la redistribution des groupements SUMO après application d'un stress thermique sur des cellules humaines (Golebiowski *et al.*, 2009). Dans cette étude, la pertinence biologique de la sumoylation des protéines Pontin et Reptin suite à un stress thermique n'a pas été étudiée. Il est possible que les protéines Pontin et Reptin puissent réguler l'expression des HSP (« Heat Shock Protein ») comme co-activateur ou co-represseur de HSF1 (« Heat Shock transcription Factor 1 »).

La sumoylation n'est pas la seule modification post-traductionnelle des protéines Pontin et Reptin pouvant moduler leurs fonctions dans la régulation transcriptionnelle. Le groupe de Baek montre que Reptin interagit avec HIF-1 α seulement lorsque Reptin est méthylée (Lee *et al.*, 2010). Reptin se fixe avec HIF-1 α sur les régions promotrices de gènes répondant à l'hypoxie. Cette fixation est associée à la répression de l'expression de ces gènes consécutivement au recrutement d'HDAC1 dépendant de Reptin sur les promoteurs (Lee *et al.*, 2010).

Les protéines Pontin et Reptin ont également été identifiées comme potentiellement porteuses d'ubiquitination (Maslon *et al.*, 2010) ou de phosphorylation (Matsuoka *et al.*, 2007

; Wang *et al.*, 2011) mais bien que la phosphorylation de Reptin de riz semble stimuler ses activités biochimiques *in vitro*, cette fois encore la pertinence biologique de ces modifications n'a pas été étudiée.

III) Pontin et Reptin dans le complexe R2TP

HSP90 est une chaperonne moléculaire essentielle pour la viabilité chez les eucaryotes. Chez l'homme, elle joue un rôle dans de nombreuses pathologies incluant des maladies neuro-dégénératives et le cancer. HSP90 reconnaît ses protéines cibles par l'intermédiaire de co-chaperonnes de sorte que chaque co-chaperonne oriente HSP90 vers un jeu de protéines définissant une des nombreuses fonctions de HSP90 dans la cellule (pour revue Taipale *et al.*, 2010). Le complexe R2TP a été identifié en 2005 par Zhao et ces collaborateurs suite à l'analyse du réseau d'interaction de la protéine chaperonne HSP90 chez la levure (Zhao *et al.*, 2005). Ce complexe est composé des protéines Pontin (aussi nommée Rvb1 chez la Levure), Reptin (aussi nommée Rvb2 chez la levure), la protéine Tah1 (« Tetratricopeptides repeat containing protein Associated with HSP90 », Spagh/RPAP3 chez l'homme) et la protéine Pih1 (« Protein Interacting with HSP90 », Nop17, PIH1D chez l'homme).

Les protéines Pontin et Reptin s'assemblent probablement en hétéro-hexamère au sein du complexe R2TP. En effet, la purification du complexe R2TP chez la levure visualisé sur gel natif ainsi qu'en microscopie électronique montre que les protéines yPontin et yReptin semblent être en quantité stœchiométrique et sous forme d'hexamère (Cheung *et al.*, 2010). De plus, certains facteurs comme BCD1 ne s'associent pas avec les protéines Pontin et Reptin prises individuellement mais seulement avec un complexe d'environ 400 kDa comprenant Pontin et Reptin (McKeegan *et al.*, 2009). Que ce soit chez l'homme ou la levure, l'analyse des interactions entre les différentes sous-unités du complexe R2TP-HSP90 supporte un modèle d'assemblage séquentiel, dans lequel HSP90, complexé à Tah1, permettrait l'association de Pih1 sur l'hétéro-hexamère de Pontin et Reptin. Une fois stabilisé sur l'hétéro-hexamère, Pih1 semble agir comme un adaptateur pour lier HSP90 et Tah1 sur l'hétéro-hexamère (Boulon *et al.*, 2008 ; McKeegan *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2008).

Chez l'homme, différentes études protéomiques mettent en évidence un complexe R2TP étendu contenant 11 protéines dont les membres du complexe R2TP, RPB5 (une sous

unité commune aux trois ARN polymérase) et Uri (« Unconventional prefoldin RPB5 Interactor ») (Boulon *et al.*, 2010 ; Cloutier et Coulombe, 2010 ; Sardiù *et al.*, 2008). Ce complexe R2TP étendu est nommé « R2TP/prefoldin-like complex ». Les preuves actuelles indiquent que le complexe R2TP est une co-chaperonne clef de HSP90. L'association R2TP-HSP90 est impliquée dans l'assemblage des snoRNPs (pour « Small NucleoOlar RiboNucleoProteins ») (Boulon *et al.*, 2008 ; Gonzales *et al.*, 2005 ; King *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2008), l'assemblage des ARN polymérases (Boulon *et al.*, 2010 ; Cloutier et Coulombe, 2010 ; Jeronimo *et al.*, 2007) et l'assemblage des kinases de la famille PIKK (pour « PhosphatidylInositol 3-Kinase-related protein Kinases ») (Horejsí *et al.*, 2010 ; Izumi *et al.*, 2010).

A) R2TP et l'assemblage des snoRNPs

Les snoARN (« Small NucleoOlar ARN ») sont des petits ARN non-codants impliqués dans la modification chimique des ARN ribosomiques (ARNr). On distingue deux familles de snoARN, les snoARN à boîte C/D et les snoARN à boîte H/ACA qui fonctionnent respectivement comme des ARN guides dans la 2'-O-méthylation et la pseudo-uridylation des ARNr. Leur maturation se fait au sein de particules ribonucléoprotéiques appelées snoRNPs. Le cœur protéique des snoRNPs à boîte C/D est composé des quatre protéines : fibrillarine (Nop1 chez la levure), Nop56, Nop58 et 15.5K/Snu13 et le cœur protéique des snoRNPs à boîte H/ACA est composé des protéines : dyskérine, Nop10, Nhp2 et Gar1 (Filipowicz et Pogacić, 2002 ; Matera *et al.*, 2007).

1) Les protéines Pontin et Reptin sont essentielles pour l'assemblage des snoRNPs...

Avant la découverte du complexe R2TP, les protéines Pontin et Reptin ont été identifiées comme des facteurs essentiels de la biogenèse des snoRNPs, que ce soit chez l'homme ou la levure.

Chez la levure, la déplétion de yReptin ou une mutation des boîtes Walker A ou B de cette protéine entraîne une perte d'accumulation des snoARN et par conséquent un défaut de maturation des ARNr (King *et al.*, 2001). Les protéines Pontin et Reptin ayant des fonctions transcriptionnelles, les auteurs ont vérifié que ce défaut d'accumulation n'était pas un effet

indirect d'une perte d'expression des gènes hôtes, des ARNm des protéines ribosomiques ou de l'ARNr (King *et al.*, 2001).

En accord avec ces résultats, chez l'homme les deux protéines Pontin et Reptin co-immunoprécipitent avec les protéines des particules snoRNPs des snoARN à boîte C/D U3 et U14 (Watkins *et al.*, 2002 ; Watkins *et al.*, 2004). Il a été montré par la suite que les protéines Pontin et Reptin interagissent directement *in vitro* avec plusieurs protéines impliquées dans l'assemblage des particules snoRNPs (fibrillarine, 15.5K, Taf9, BCD1 et Nufip) (McKeegan *et al.*, 2007). De manière intéressante, pour les protéines 15.5K et BCD1, ces interactions *in vitro* sont sensibles à la présence de co-facteurs nucléotidiques (McKeegan *et al.*, 2007 ; McKeegan *et al.*, 2009), suggérant que l'activité ATPase des protéines Pontin et Reptin doit être requise pour la dynamique d'assemblage des snoRNPs.

2) ... au sein du complexe R2TP.

L'ensemble de ces résultats impliquent clairement les protéines Pontin et Reptin comme facteurs essentiels de l'assemblage des snoRNPs. Indépendamment de ces observations, Zhao *et al.* (2005) identifient le complexe R2TP chez la levure ainsi que son interaction avec HSP90 (Zhao *et al.*, 2005). Subséquemment, R2TP-HSP90 a été impliqué dans la biogenèse des snoRNPs. Que ce soit chez la levure ou chez l'homme, l'activité de HSP90 et les quatre sous-unités du complexe R2TP sont requises pour l'accumulation des snoRNPs (Boulon *et al.*, 2008 ; McKeegan *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2008).

R2TP et HSP90 sont associées avec les snoRNPs immatures par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice, Nufip (Rsa1 chez la levure). Nufip interagit spécifiquement avec Pih1, Pontin et Reptin ainsi qu'avec les protéines du cœur des snoRNPs. Chez la levure, le rôle de Nufip dans la biogenèse des snoRNPs semble être restreint aux snoRNPs à boîte C/D, tandis que chez l'homme, Nufip participe à la biogenèse des snoRNPs à boîte C/D et H/ACA (Boulon *et al.*, 2008).

Notons que les snoRNPs appartiennent à une famille plus large de RNPs, la famille des L7Ae. Ces RNPs incluent les snoRNPs à boîte C/D et H/ACA dont le RNP de la télomérase, la snoRNP spliceosomale U4 et des mRNPs codant les séléno-protéines. Les ARN des RNPs de la famille L7Ae présentent un motif structural commun qui est spécifiquement reconnu par trois protéines de la famille L7Ae : 15.5K (pour les ARNs U4 et

C/D) (Watkins *et al.*, 2000), Nhp2 (pour les ARN H/ACA) (Kiss *et al.*, 2010) et SBP2 (pour les mRNPs codant les séléno-protéines) (Allmang *et al.*, 2002 ; Copeland *et al.*, 2000). Ces protéines s'associent initialement à leur ARN et cette association permettrait le recrutement des autres facteurs impliqués dans la maturation de ces RNPs. Comme nous l'avons vu, Boulon et ses collaborateurs ont récemment montré que la protéine Nufip permettrait de faire le lien entre le complexe R2TP-HSP90 et les protéines du cœur des snoRNPs à boîte C/D et H/ACA. Ce rôle pourrait être étendu à tous les RNPs de la famille L7Ae. En effet, ils montrent que Nufip interagit avec 15.5K, Nhp2 et SBP2. De plus, HSP90 est requise pour la stabilité de ces protéines *in vivo* (Boulon *et al.*, 2008). Ils observent également que l'ARN U4 co-immunoprécipite avec chacune des protéines du complexe R2TP-HSP90, et la protéine SBP2 co-immunoprécipite avec Pontin, Reptin et Pih1 (Boulon *et al.*, 2008), suggérant qu'au moins chez les mammifères le complexe R2TP-HSP90 peut jouer un rôle dans la biogenèse de tous les RNPs de la famille L7Ae.

Enfin, une étude récente a permis de mettre en évidence que le complexe R2TP participe à l'étape initiatrice de la maturation des snoARN H/ACA de façon ATP et HSP90 indépendante (Machado-Pinilla *et al.*, 2012). La première étape de la maturation des snoARN à boîte H/ACA est la dissociation du complexe Shq1-dyskérine. Une fois libérée, la dyskérine peut reconnaître et fixer les snoARN à boîte H/ACA, initiant leur maturation. Dans des extraits cytosoliques de cellules HeLa qui contiennent tous les facteurs nécessaires à l'assemblage des snoRNPs et au relargage de Shq1, Machado-Pinilla *et al.* (2012) montrent que l'inactivation de HSP90 ou le retrait de l'ATP par l'ajout d'apyrase n'a aucun effet sur le relargage de Shq1. Par contre, lorsqu'ils piègent chaque composant du complexe R2TP par l'ajout d'anticorps, le relargage de Shq1 est grandement affecté (Machado-Pinilla *et al.*, 2012). De plus, la déplétion des protéines Pontin et Reptin conduit à la perte d'accumulation des snoRNPs à boîte H/ACA (Machado-Pinilla *et al.*, 2012) dont le snoARN à boîte H/ACA TERC (« TElomérase RNA Component ») (Venteicher *et al.*, 2008). Parce que Pontin et Reptin interagissent directement avec la dyskérine (Venteicher *et al.*, 2008) et Shq1 (Machado-Pinilla *et al.*, 2012), et parce que Pontin et Reptin sont essentielles pour l'accumulation des snoRNPs à boîte H/ACA (Machado-Pinilla *et al.*, 2012 ; Venteicher *et al.*, 2008), ils proposent que le mécanisme du complexe R2TP dans l'assemblage des snoARN H/ACA est d'être directement responsable du désassemblage du complexe Shq1-dyskérine dans un mécanisme indépendant de HSP90 (Machado-Pinilla *et al.*, 2012).

En conclusion, le complexe R2TP joue un rôle à plusieurs niveaux dans la maturation des snoRNPs. Il initie la maturation des snoRNPs à boîte H/ACA et, avec HSP90, il participe à la maturation des snoRNPs C/D chez la levure et de l'ensemble des RNPs de la famille L7Ae chez l'homme. Notons cependant que, si les derniers travaux mettent en évidence un rôle clef du complexe R2TP dans l'assemblage de ces RNPs, Pontin et Reptin ont été identifiées associées indépendamment l'une de l'autre avec des snoRNPs à différentes étapes de leur maturation (Watkins *et al.*, 2004 ; Watkins *et al.*, 2007). Il semble donc possible que Pontin et Reptin puissent également participer à la maturation des RNPs à l'extérieur du complexe R2TP (**Figure 11A**).

B) R2TP et l'assemblage des kinases de la famille PIKK

Les « PhosphatidyInositol 3-Kinase-related protein Kinases » (PIKK) constituent une famille de six protéines structurellement similaires. On y trouve : ATM, ATR et DNA-PKcs, trois kinases impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN et sa réparation ; mTOR, qui contrôle la synthèse de protéines et la biogenèse des ribosomes en réponse au stress nutritionnel ; SMG1, qui contrôle le mécanisme de surveillance de la traduction, connue sous le nom de « Nonsense-Mediated Decay » (NMD), c'est-à-dire qu'un ARN messager qui présente un codon stop prématuré est dégradé ; TRRAP, qui ne présente pas d'activité kinase et qui est impliquée dans le remodelage chromatinien (Abraham, 2004).

Les protéines Pontin et Reptin régulent toutes les PIKKs au travers de trois mécanismes (Horejsí *et al.*, 2010 ; Izumi *et al.*, 2010). Premièrement, elles stabilisent les protéines PIKKs nouvellement synthétisées. Par l'intermédiaire de Tel2, protéine essentielle pour la stabilité des six PIKKs, le complexe R2TP est associé physiquement avec toutes les protéines PIKKs. Ce recrutement est nécessaire pour la stabilité des PIKKs (Horejsí *et al.*, 2010). Deuxièmement, Pontin et Reptin participent à l'expression des PIKKs. La déplétion des protéines Pontin et Reptin diminue l'abondance des protéines PIKKs et leurs ARN messagers. Etant donné que les protéines Pontin et Reptin ont des fonctions dans la régulation transcriptionnelle, il est tout à fait envisageable que les protéines Pontin et Reptin participent directement à la régulation transcriptionnelle des protéines PIKKs. Par exemple, la transcription des gènes codant ATM et DNA-PKcs est sous le contrôle de E2F1 (Berkovich et Ginsberg, 2003), lequel peut-être régulé par Pontin et Reptin (Dugan *et al.*, 2002). Enfin, les

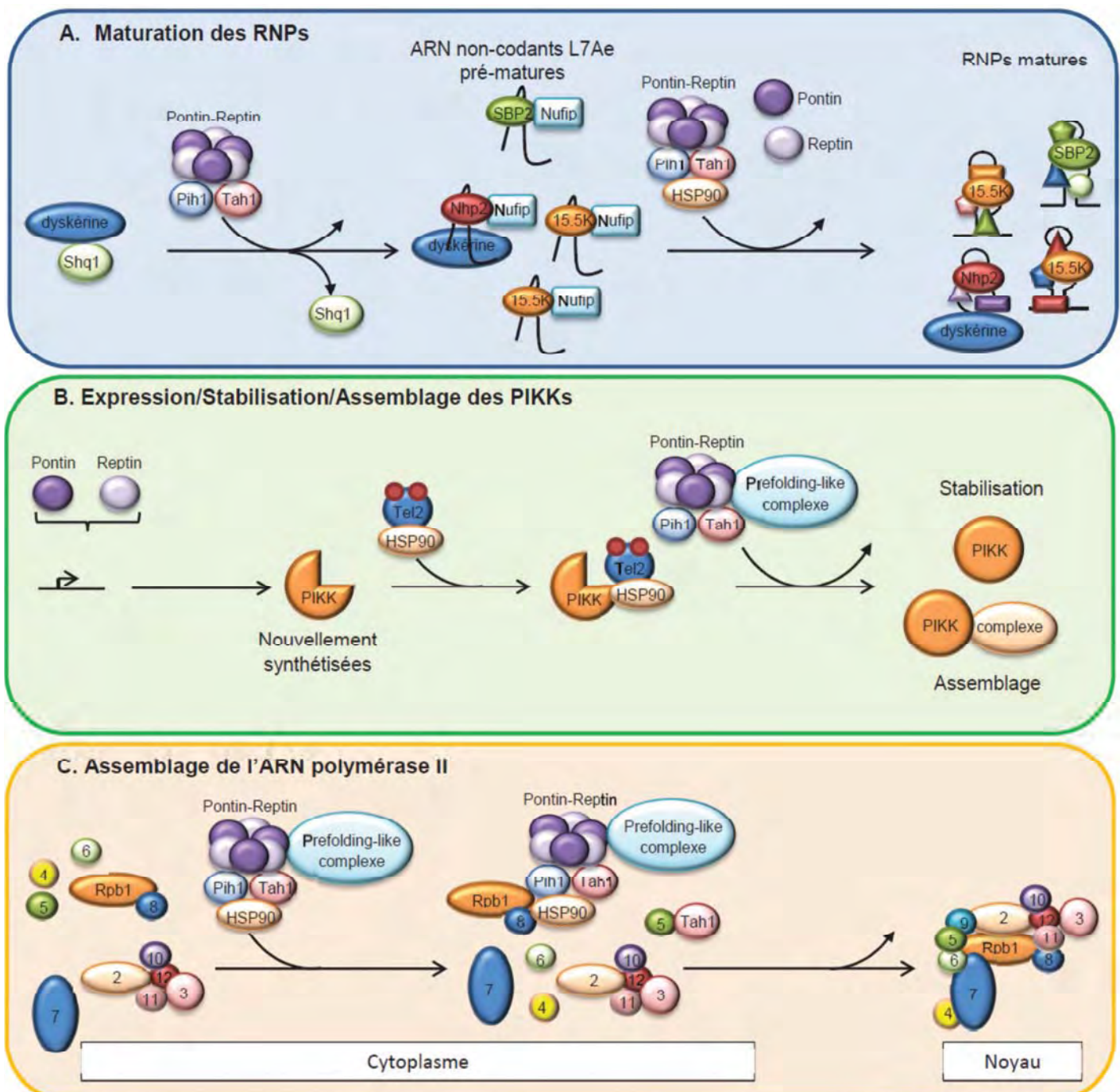


Figure 11. Fonctions du complexe R2TP. Les chaînes d'événements de ces schémas sont hypothétiques et basées sur les expériences réalisées chez plusieurs espèces. **A.** Le complexe R2TP fonctionne dans l'assemblage des RNPs de la famille L7Ae. R2TP est nécessaire pour désassembler le complexe Shq1-dyskérine, étape nécessaire pour que la dyskérine puisse fixer les snoARN à boîte H/ACA initiant la maturation de ces snoRNPs. Nous ne pouvons pas exclure que le complexe R2TP reste associé avec la dyskérine sur les snoARN à boîte H/ACA, même si l'inverse est représenté sur ce schéma. Le complexe R2TP-HSP90, et sans doute Pontin et Reptin seules, est requis pour l'assemblage des snoRNPs à boîte C/D chez la levure et l'homme. Ce rôle apparaît concerner tous les ARN non-codants de la famille L7Ae chez l'homme : snoRNPs à boîte C/D mais aussi à boîte H/ACA, le snRNP U4 et les mRNPs codant les sélénoprotéines. **B.** Le complexe R2TP fonctionne dans la stabilisation des protéines PIKKs et leur assemblage. Les PIKKs nouvellement synthétisées, dont l'expression dépend de Pontin et Reptin, interagissent avec Tel2 assistée par HSP90. Tel2 phosphorylée permet l'interaction entre les PIKKs et le complexe R2TP/Prefolding-like pour éventuellement conduire à l'assemblage des PIKKs en complexe. **C.** Le complexe R2TP fonctionne dans l'assemblage de l'ARN polymérase II. Le complexe R2TP-HSP90/Prefolding-like interagit avec la protéine Rpb1 libre. Tah1 (RPAP3 ou Spagh) s'associe également avec Rpb5 indépendamment du complexe R2TP. Le complexe R2TP permet l'assemblage cytoplasmique de l'ARN polymérase II. Les nombres se réfèrent aux sous-unités de l'ARN polymérase II de Rpb1 à 12. Pour partie, d'après Kakiyama et Houry (2012) *BBA* 1823 : 101-107.

protéines Pontin et Reptin peuvent influencer directement la fonction des protéines PIKKs. En effet, Pontin et Reptin sont nécessaires pour incorporer SMG1 dans un complexe NMD fonctionnel (Izumi *et al.*, 2010) (**Figure 11B**) mais aussi pour la localisation de mTOR aux lysosomes (Kim *et al.*, 2012) et pour l'association ATR-ATRIP.

C) R2TP et l'assemblage de l'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II (ARNpolII) est composée de 12 sous-unités (Rbp1 à 12) mais leur assemblage est peu connu. Récemment, les membres du complexe R2TP/prefoldin-like ont été identifiés dans un crible protéomique ciblant les partenaires protéiques de l'ARNpolII (Cloutier et Coulombe, 2010 ; Jeronimo *et al.*, 2007), suggérant que R2TP peut être impliqué dans cet assemblage.

Une élégante étude en cellule humaine alliant de la protéomique quantitative et de la microscopie en fluorescence a permis de disséquer le mécanisme d'assemblage de l'ARNpolII (Boulon *et al.*, 2010). Les auteurs montrent que le traitement des cellules à l' α -amanitine (désassemble l'ARNpolII en se fixant à la sous-unité Rbp1 et dégrade cette sous-unité) et à la leptomycine B (LMB, inhibiteur de l'exportin CRM1) conduit à l'accumulation de la grosse sous-unité de l'ARNpolII, Rpb1, dans le cytoplasme. De plus, la déplétion de chaque sous-unité de l'ARNpolII par ARN interférence entraîne l'accumulation cytoplasmique de Rpb1. Ces observations suggèrent que l'assemblage de l'ARNpolII se réalise dans le cytoplasme et que l'assemblage cytoplasmique est essentiel pour son importation dans le noyau (Boulon *et al.*, 2010).

L'utilisation combinée des drogues permet à Boulon *et al.* de purifier différents niveaux d'assemblage de l'ARNpolII. L'analyse par protéomique quantitative d'immunopurification de ces assemblages permet d'identifier les partenaires des sous-unités de l'ARNpolII suivant leur niveau d'assemblage (Boulon *et al.*, 2010). Cette approche démontre l'existence de sous complexes cytoplasmiques de l'ARNpolII, l'un formé des sous-unités Rpb1 et Rpb8 et l'autre formé des sous-unités Rpb2-3-10-11-12. R2TP/prefoldin-like ainsi que d'autres protéines interagissant avec l'ARNpolII (Rpap2, Gpn1, Gpn3, and GrinL1A) qui sont retrouvés associés au sous complexe Rpb1-Rpb8. Ces résultats sont confirmés par l'analyse protéomique de complexes Rpb1 immuno-purifiés à partir de cellules traitées ou non à l'actinomycine D, qui inhibe la transcription sans induire la dégradation des

sous-unités de l'ARNpolIII ou l'accumulation cytoplasmique de Rpb1 (Boulon *et al.*, 2010). Dans ces conditions, l'association du complexe R2TP/prefoldin-like avec Rpb1 est plus difficilement détectable, indiquant que R2TP/prefolding-like interagit préférentiellement avec Rpb1 lorsque celle-ci n'est pas assemblée. L'analyse quantitative de complexes Tah1 immuno-purifiés de cellules non-traitées révèle son association avec les composants du complexe Prefolding-like ainsi qu'avec quatre sous-unités de l'ARNpolIII (Rpb1, 2, 5 et 8). Il est également montré que Tah1 interagit avec Rpb1 principalement dans le cytoplasme et que Tah1 est également associée avec Rpb5 indépendamment du sous-complexe contenant Rpb1. De plus, l'inhibition de l'activité d'HSP90 par l'utilisation de geldanamycine déstabilise Rpb1 non-assemblée accumulée suite aux traitements d' α -amanitine et de LMB ou à la déplétion de Rpb2 (Boulon *et al.*, 2010).

Basés sur ces observations, Boulon *et al.* concluent que le complexe R2TP-HSP90/prefolding-like est requis pour l'assemblage cytoplasmique de l'ARNpolIII par son association avec Rpb1 (Boulon *et al.*, 2010) (**Figure 11C**).

Boulon *et al.* proposent que le complexe R2TP-HSP90/prefolding-like puisse avoir un rôle similaire dans l'assemblage de l'ARNpolII et III. En effet, ces ARN polymérases nucléaires sont structurellement similaires et partagent quelques sous-unités communes, incluant Rpb5 (Vannini et Cramer, 2012). L'analyse protéomique de complexes hTah1 révèle son interaction avec la sous-unité la plus large de l'ARNpolII (Rpa190/A190) et celle de l'ARNpolIII (Rpc160/C160) (Boulon *et al.*, 2010 ; Boulon *et al.*, 2012 ; Jeronimo *et al.*, 2007). De plus, le blocage de l'assemblage de l'ARNpolII augmente l'interaction entre Tah1 et la sous-unité la plus large de l'ARNpolII. Ces résultats suggèrent une similarité dans les voies d'assemblage des trois ARN polymérases, et indiquent que le complexe R2TP peut être requis pour la stabilisation des formes non-assemblées des larges sous-unités de toutes les ARN polymérases (Boulon *et al.*, 2010).

D) R2TP dans l'assemblage de la télomérase ?

La télomérase est une RNP composée de trois composants essentiels, la protéine TERT (« TElomerase Reverse Transcriptase »), le petit ARN TERC (« TElomerase RNA Component ») et la dyskérine qui lie le composant ARN (Cohen *et al.*, 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines Pontin et Reptin sont essentielles à la maturation du

composant ARN de la télomérase (Machado-Pinilla *et al.*, 2012 ; Venteicher *et al.*, 2008) ainsi qu'à l'expression de l'ARNm de TERT (Li *et al.*, 2010). Toutefois, leur implication dans le maintien des télomères ne semble pas s'arrêter ici. En effet, les protéines hPontin et hReptin ont été décrites comme deux nouvelles sous-unités essentielles pour l'assemblage du complexe télomérase dans des cellules HeLa (Venteicher *et al.*, 2008).

Rappelons que chez l'homme l'holoenzyme télomérase est spécifiquement assemblée pendant la phase S, or Venteicher *et al.* (2008) ont identifié un complexe spécifique de la phase S comprenant TERT, Pontin et Reptin. Ce complexe TERT-Pontin-Reptin est dépourvu de la dyskérine et de TERC. Parallèlement, ils montrent que Pontin et Reptin interagissent avec TERT et la dyskérine indépendamment du composant TERC (Venteicher *et al.*, 2008). Les auteurs proposent alors que les protéines Pontin et Reptin sont responsables de l'assemblage de l'holoenzyme télomérase de façon dépendante du cycle cellulaire en permettant l'association de TERT avec la dyskérine d'une part et TERC d'autre part (Venteicher *et al.*, 2008).

Par simple analogie avec le rôle du complexe HSP90-R2TP dans l'assemblage de nombreux RNPs (Boulon *et al.*, 2008 ; Gonzales *et al.*, 2005 ; King *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2008), il ne serait pas étonnant que l'assemblage de l'holoenzyme télomérase implique ce complexe en entier et pas seulement les protéines Pontin et Reptin. En accord avec cette hypothèse, HSP90 a également été proposée comme chaperonne permettant l'association de TERT avec TERC. En effet, l'inhibiteur de HSP90, la geldanamycine, réduit la production de RNP télomérase humaine active et induit la dégradation de TERT médiée par le protéasome (Forsythe *et al.*, 2001 ; Holt *et al.*, 1999 ; Kim, Park *et al.*, 2005).

IV) Division cellulaire

Plusieurs études ont impliqué les protéines Pontin et Reptin dans le processus de la mitose (Ducat *et al.*, 2008 ; Gartner *et al.*, 2003 ; Sigala *et al.*, 2005). La localisation subcellulaire des protéines Pontin et Reptin suggère qu'elles aient un rôle à chaque étape de la mitose. En effet, hPontin et hReptin co-localisent avec le fuseau mitotique et les centrosomes en métaphase (Gartner *et al.*, 2003 ; Sigala *et al.*, 2005). Puis en anaphase, seule hReptin se redéploie ensuite dans la zone centrale des microtubules en anaphase pour finir par se concentrer au niveau de l'anneau contractile (à partir duquel se fait la scission entre deux

cellules filles) en télophase (Sigala *et al.*, 2005). De plus, une approche protéomique et un crible basé sur la mise en silence par ARNi permettant d'identifier des régulateurs du fuseau mitotique ont impliqué les protéines Pontin et Reptin dans cette fonction mitotique (Ducat *et al.*, 2008).

La fonction de Pontin et Reptin au sein de l'appareil mitotique n'est pas claire. hPontin interagit avec la tubuline et induit la polymérisation des microtubules *in vitro* (Gartner *et al.*, 2003). En utilisant des extraits d'œufs de xénope, Ducat *et al.* (2008) montrent que les protéines xPontin et xReptin interagissent avec γ TuRC (« gamma Tubulin Ring Complexe » nécessaire pour la nucléation du fuseau aux centrosomes) et qu'elles sont requises pour l'assemblage des microtubules *in vitro* par ces extraits nucléaires (Ducat *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent que Pontin et Reptin puissent être impliquées dans le processus d'assemblage des microtubules. En accord avec ceci, la déplétion de Pontin par siARN en culture cellulaire conduit à une augmentation des défauts d'assemblage et d'organisation du fuseau mitotique (Ducat *et al.*, 2008). Il est possible que les protéines Pontin et Reptin fonctionnent comme des chaperonnes pour faciliter l'assemblage des microtubules en interagissant avec γ TuRC. Elles pourraient alors faciliter la localisation de γ TuRC le long des microtubules et également aux centrosomes. D'ailleurs, hPontin a également été retrouvée dans un complexe nécessaire à l'organisation du fuseau mitotique contenant, en plus de hPontin, ILK (« Integrin-Linked Kinase »), α -tubulin, β -tubulin (Fielding *et al.*, 2008). Cette étude révèle que la localisation de ILK aux centrosomes nécessite la présence de Pontin (Fielding *et al.*, 2008) appuyant l'idée que les protéines Pontin et Reptin peuvent avoir un rôle pour faciliter la localisation de complexes protéiques lors de la mitose.

Chapitre 3 : Structures et enzymologies des protéines Pontin et Reptin.

Les protéines Pontin et Reptin font partie de la superfamille des AAA + (ATPases Associées à diverses Activité cellulaires) mais au sein de cette famille, ces protéines forment un groupe taxonomique relativement distinct des autres membres, suggérant qu'elles doivent avoir des propriétés uniques (Ammelburg *et al.*, 2006). Au cours de l'évolution, les protéines AAA + se sont spécialisées de telle sorte que chaque membre de cette famille est typiquement confiné à un processus cellulaire particulier (Snider and Houry, 2008). Les protéines Pontin et Reptin ne suivent pas ce modèle. En effet, ces protéines ont été impliquées dans de nombreux processus cellulaires aussi divers que variés tels que le remodelage de la chromatine, la régulation de la transcription, la maturation des petits ARNs nucléolaires ou encore la division cellulaire (Huen *et al.*, 2010).

Depuis 2006, plusieurs structures des protéines purifiées de Pontin et Reptin ont été rapportées. Un homo-hexamère de hPontin (Matias *et al.*, 2006) et un homo-hexamère de hReptin (Petukhov *et al.*, 2012) ont été résolus par diffraction au rayon X. En 2008, une étude par microscopie électronique a montré un complexe contenant à la fois yPontin et yReptin assemblées en hétéro-hexamère (Gribun *et al.*, 2008). Finalement, plusieurs études ont permis de décrire différents hétéro-dodécamères des protéines Pontin et Reptin humaines ou de levure (Cheung *et al.*, 2010 ; Gorynia *et al.*, 2011 ; López-Perrote *et al.*, 2012 ; Puri *et al.*, 2007 ; Torreira *et al.*, 2008). Malgré le haut niveau de conservation de ces protéines, on retrouve des différences significatives entre toutes ces structures. Ces différences sont retrouvées non seulement entre les structures assemblées à partir de protéines Pontin/Reptin issues de différentes espèces, mais également entre les structures issues de protéines d'une même espèce. Après une description des principales caractéristiques des structures présentes dans la littérature, nous essaierons d'évaluer si ces différences peuvent être dues aux conditions expérimentales utilisées dans ces études ou bien, si elles peuvent être le reflet de multiples états oligomériques fonctionnels physiologiques.

I) Structures des monomères extraites de leur assemblage hexamérique:

La structure à l'échelle atomique de monomères de Pontin est issue de la résolution d'un cristal d'homo-hexamère de hPontin (Matias *et al.*, 2006). La structure à l'échelle atomique de Reptin n'a été résolue que pour des formes tronquées de la région externe du

domaine DII (Gorynia *et al.*, 2011 ; Petukhov *et al.*, 2012)(voir ci-dessous). Néanmoins, cette région a été résolue par RMN (Code d'accèsion PDB : 2cqa).

A) Pontin :

Le monomère de hPontin se replie en 3 domaines (DI, DII et DIII). Le domaine DI contient les acides aminés 1-120 et 296-365, le domaine DII les acides aminés 121-295 et le domaine DIII les acides aminés 366-456 (**Figure 12**).

Les domaines DI et DIII forment le module typique des protéines AAA+. Dans le domaine DI, on retrouve la structure conservée $\alpha\beta\alpha$, consistant en 5 brins β encadrés par des hélices α . Cette structure contient les boîtes Walker A et Walker B qui permettent respectivement la fixation et l'hydrolyse du nucléotide et le senseur-1 qui vient assister l'hydrolyse de l'ATP. Dans le domaine DIII, on retrouve la structure conservée en fagot de 4 hélices α contenant le senseur-2, celui-ci étant généralement impliqué dans la détection de la présence d'ATP ou d'ADP et donc dans le changement de conformation en conséquence (Wendler *et al.*, 2012).

Le domaine DII, inséré dans le domaine DI, est spécifique des protéines Pontin et Reptin. Ce domaine peut se subdiviser en deux sous-régions, une interne et une externe. La région interne est formée par deux hélices α , nommées X et Y, reliées entre elles par une boucle non résolue dans le cristal. La région externe est structurée en OB (« Oligosaccharide/Oligonuléotide Binding »)-fold consistant en un tonneau- β de 5 brins- β antiparallèles fermés par une hélice- α . Notons que les OB-fold sont également impliqués dans des interactions protéine-protéine (Arcus, 2002). Ce domaine DII est relié au domaine DI par deux longs brins- β ce qui lui confère une grande liberté de mouvement par rapport au module DI/DIII (**Figure 12B**).

B) Reptin :

Comme nous pouvions nous y attendre au vu de la forte homologie de séquences entre ces deux protéines orthologues, il y a peu de différences entre la structure tridimensionnelle de Pontin et la structure de Reptin. On retrouve les trois domaines DI, DII et DIII (**Figure 12**).

DI et DIII forment également dans cette protéine le module AAA+ dans lequel on retrouve les boîtes Walker A et B ainsi que les senseurs-1 et -2.

A.

hPontin	-----MKIEEVKSTTKTQRIASHSHVKGLGLDESGLAKQAASGLVGQENAREACGVIV	53
hReptin	MATVTATTKVPEIRDVTRIERIGAHSHIRGLGLDDALEPRQASQGMVGLAARRAAGVVL	60
hPontin	ELIKSKKMAGRAVLLA GPPGTGKT ALALAI AQELGSKVPFCPMVGSEVYSTEIKKTEVLM	113
hReptin	EMIREGKIAGRAVLIA GQPGTGKT AIAMGMAQALGPDTPFTAIAGSEIFSLEMSKTEALT	120
hPontin	ENFRRAIGLRIKETKEVYEGEVTELTPCETENPMGGYGKTISHVVIIGLKTAKGTKQLKLD	173
hReptin	QAFRRSIGVRIKEETEIEIEGEVVEIQI---DRPATGTGSKVGKL--TLKTTEMETIYDLG	175
hPontin	PSIFESLQKERVEAGDVIYIEANS GAVKRQGRCDTYATEFDLE--AEEYVPLPKGDVHKK	231
hReptin	TKMIESLTKDKVQAGDVITIDKATGKISKLGSRSFTRARDYDAMGSQTKFVQCPDGELQKR	235
hPontin	KEIIQDVTLHDLVDVANARPQGGQDILSMMGQLMKPKKTEITDKLRGEINKVVNKYIDQGI	291
hReptin	KEVVHTVSLHEIDVINSRTQGFLALFS-----GDTGEIKSEVREQINAKVAEWREEGK	288
hPontin	AELVPGVLFV DEVH MLDIECFYTLHRALESSIAPIVIFASNRGNCVIRGTEDITSPHGIP	351
hReptin	AEIIPGVLFID EVH MLDIESFSFLNRALES DMAPVLIMATNRGITRIRGTS-YQSPHGIP	347
hPontin	LDLLDRVMIIRTMLYTPQEMKQIIKIRAQTEGINISEEALNHLGEIGTK TT LRYSVQLLT	411
hReptin	IDLLDRLLIVSTTPYSEKDTKQILRIRCEEEDVEMSEDAYTVLTRIGLET SL RYAIQLIT	407
hPontin	PANLLAKINGKDSIEKEHVEEISELFYDAKSSAKILADQQDKYMK-----	456
hReptin	AASLVCRKRKGTEVQVDDIKRVYSLFLDES RSTQYMKEYQDAFLFNLKGETMDTS	463

B.

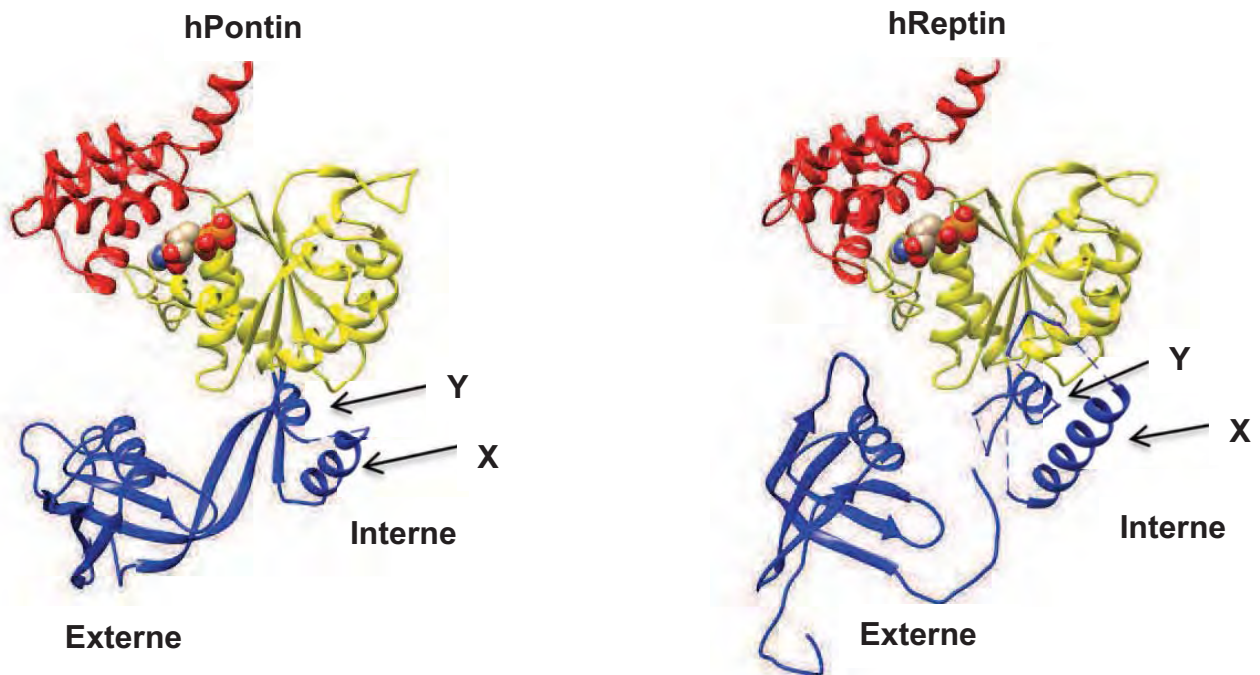


Figure 12. Structures primaires et tertiaires des protéines hPontin et hReptin **A.** Séquence d'acides aminés des protéines hPontin et hReptin. Les séquences des protéines hPontin et hReptin ont été alignées à l'aide du programme Clustal O (1.2.0) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. La bande jaune indique le domaine I, la bande bleu le domaine II et la bande rouge le domaine III. Les encadrements en noir indiquent les régions correspondant aux Walker A et B, aux senseurs 1 et 2 ainsi qu'au doigt arginine. **B.** Comparaison des monomères de hPontin (à gauche) (code PDB : 2C9O) et hReptin (à droite) (code PDB : 3UK6 et 2CQA pour la région externe du domaine II). Chaque structure est schématisée en ruban avec le domaine I coloré en jaune, le domaine II coloré en bleu et le domaine III coloré en rouge. Les molécules d'ADP sont représentées en espace de remplissage avec les atomes colorés en gris pour les carbones, rouge pour les oxygènes, bleu pour les nitrogènes et orange pour les phosphores. Les hélices dénommées X et Y dans le texte sont indiquées par une flèche.

En ce qui concerne le domaine DII, comme pour le monomère de hPontin (Matias *et al.*, 2006) la région interne est composée des hélices X et Y reliées entre elles par une boucle partiellement résolue (Petukhov *et al.*, 2012). On retrouve une structure en OB-fold dans la région externe du domaine DII (**Figure 12B**).

II) Structure des hexamères :

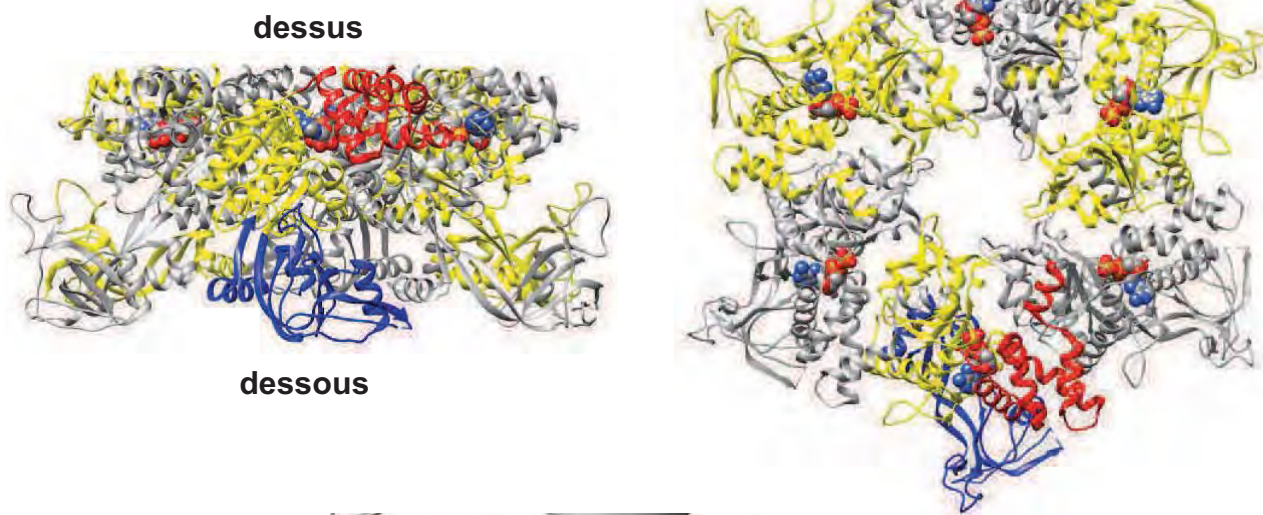
A) Structure cristallographique d'un homo-hexamère de la protéine hPontin :

La structure cristallographique d'un hexamère de hPontin a été résolue par Matias *et al.* (2006). Au sein de cet hexamère, les monomères interagissent par les domaines DI et DIII (**Figure 13A**). Le module DI/DIII d'un monomère interagit avec le domaine DIII du monomère adjacent, fermant ainsi la poche catalytique contenant le cofacteur nucléotidique. Cette organisation est commune à plusieurs protéines de la famille AAA+ tels que l'ARN hélicase p4 du bactériophage $\phi 12$ (Mancini EJ *et al.*, 2004) ou encore l'hélicase réplicative virale E1 du Papillomavirus (Enemark and Joshua-Tor, 2006). Cette organisation permet une coopérativité dans l'hydrolyse de l'ATP entre les monomères. En effet, pour ce type d'assemblage un doigt arginine présent sur un monomère permet une hydrolyse efficace de l'ATP présent dans la poche catalytique du monomère adjacent (Erzberger *et al.*, 2002 ; Iyer *et al.*, 2003 ; Neuwald *et al.*, 1999).

1) Fixation et hydrolyse de l'ATP

La présence d'ADP dans le cristal nous permet d'évaluer comment les éléments conservés du module AAA+ s'organisent autour du nucléotide (**Figure 13B**). De plus, en superposant les coordonnées de l'hexamère de hPontin avec ceux de RuvB (Putnam *et al.*, 2001), NSF-D2 (Lenzen *et al.*, 1998) et de l'hélicase SV40 (Li *et al.*, 2003), les auteurs ont pu prédire quels acides aminés seraient impliqués dans la fixation et l'hydrolyse du nucléotide. Ainsi, ils proposent que les résidus Gly-73 et Thr-77 du motif Walker A pourraient respectivement stabiliser le phosphate en γ d'une molécule d'ATP et coordonner le Mg^{2+} . Pour le motif Walker B, les résidus Asp-302 à His-305 sont dans une position adéquate pour être responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Ils interagiraient avec le Mg^{2+} et permettraient l'attaque nucléophile de l'eau sur l'ATP. En plus des motifs Walker, l'Asn-332 dans le senseur-1 et l'Arg-404 dans le senseur-2 présenteraient des interactions polaires avec les

A.



B.

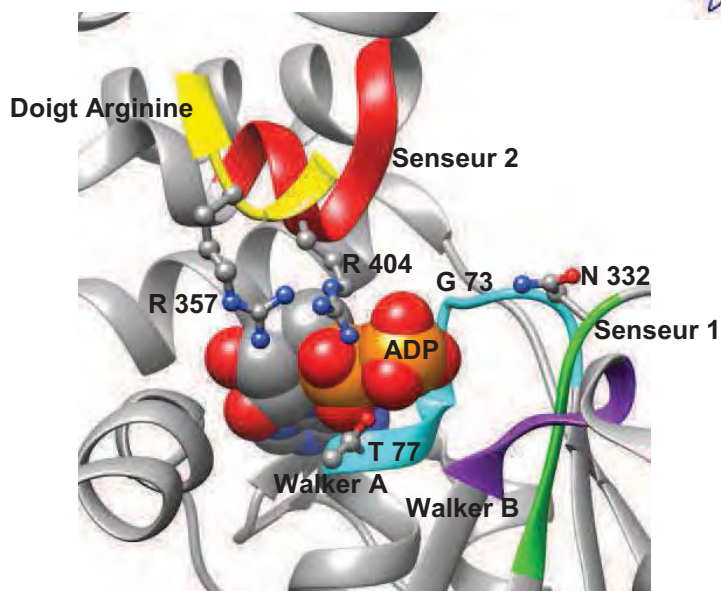


Figure 13. Hexamère de hPontin (Code PDB : 2C9O) et focus sur la poche catalytique. **A.** Vue de côté (à gauche) et vue du dessus (à droite) de l'hexamère de hPontin. Deux protomères adjacents sont représentés en ruban de couleur grise et jaune. Un protomère est représenté avec le même code couleur que la **Figure 12B**. Les molécules d'ADP sont représentées avec le même code couleur que la **Figure 12B**. **B.** Représentation de la poche catalytique de l'hexamère de hPontin. Les protéines sont représentées en ruban et colorées en gris. La région Walker A est colorée en cyan, le Walker B en violet, la région du senseur 1 est colorée en vert, le senseur 2 est en rouge et le doigt arginine d'un monomère adjacent est coloré en jaune. L'ADP est représenté en surface de remplissage. Les acides aminés du Walker A T77 et G73, du senseur 1 N332, du senseur 2 R404 et le doigt arginine R357 sont représentés en billes et bâtons et les atomes (ceux de l'ADP y compris) sont colorés en gris pour le carbone, bleu pour le nitrogène, rouge pour l'oxygène et orange pour le phosphore.

(A) Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8) <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

(B) D'après Matias *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 38918-38929.

phosphates en β ou γ du nucléotide. Par interaction avec le phosphate en γ , le senseur-1 permettrait de distinguer la présence d'ADP ou d'ATP dans la poche catalytique. Le senseur-2 permettrait de distinguer la présence ou l'absence de nucléotide par interaction avec les phosphates en β ou γ . L'Arg-357 pourrait avoir la fonction du doigt arginine permettant une coopérativité entre les monomères au sein de l'hexamère et une hydrolyse de l'ATP efficace (Matias *et al.*, 2006). En revanche, les expériences *in silico* de dynamique moléculaire sur la modélisation d'un hexamère de hPontin effectuées par Petukhov *et al.* (2012) suggèrent que cette arginine est piégée par des liaisons hydrogènes qu'elles formeraient avec l'Asp-353 du même protomère. De plus, ces mêmes expériences suggèrent que l'arginine du senseur-2 joue le rôle du doigt arginine mais avec une action non pas en trans comme cela est classiquement proposé, mais en cis au sein d'un même protomère (Petukhov *et al.*, 2012). Il reste encore à valider expérimentalement toutes ces suppositions.

La structure du complexe hPontin-ADP nous révèle par ailleurs que l'hexamérisation bloque l'ADP dans son site catalytique empêchant ainsi son relargage et donc l'échange avec une molécule d'ATP. Cette observation peut expliquer l'absence d'activité ATPase observée pour les homo-hexamères des protéines Pontin et Reptin (Elkaim *et al.*, 2012 ; Matias *et al.*, 2006 ; Papin *et al.*, 2010). Néanmoins, les expériences *in silico* réalisées par Petukhov *et al.* (2012) suggèrent que l'Arg-404 du senseur-2 aurait un rôle de valve permettant la gestion de l'entrée et sortie du nucléotide de la poche catalytique. On observe un effet de fermeture du site catalytique quand cette arginine est en contact avec les phosphates β et γ de l'ATP, puis elle s'écarte du site catalytique permettant la sortie du nucléotide (Petukhov *et al.*, 2012).

2) Fixation d'acide nucléique

Globalement, l'hexamère est composé de deux anneaux, un anneau d'un diamètre de 94 Å formé par les domaines DI et DIII, et un anneau de 117 Å, composé du domaine DII. L'hexamérisation forme un canal central d'environ 18 Å. L'entrée du canal par la surface supérieure et l'intérieur du canal est chargée négativement, l'entrée du canal par la face inférieure est chargée positivement. Etant donné qu'une activité hélicase est proposée pour la Pontin (Kanemaki *et al.*, 1999 ; Makino *et al.*, 1999), le diamètre et la répartition du potentiel électrostatique du canal central nous suggèrent que ce dernier peut permettre une translocation sur de l'acide nucléique simple brin à l'image de ce qui est proposé pour les hélicases hexamériques telles que l'ARN hélicase p4 du bactériophage $\phi 12$ (Mancini *et al.*, 2004),

l'hélicase RecA-like Rho (Thomsen and Berger, 2009) ou l'hélicase répllicative E1 du Papillomavirus (Enemark and Joshua-Tor, 2006). Pour ces hélicases, l'interaction avec l'ADN au sein du canal central est médiée par une ou plusieurs boucles. Deux boucles sont retrouvées aux entrées du canal de l'hexamère de hPontin. Une boucle chargée positivement (du résidu 101 au résidu 108) située à l'entrée inférieure du canal central et une boucle chargée négativement (du résidu 334 au résidu 351) située à l'entrée supérieure du canal. Néanmoins, l'implication de ces boucles dans une interaction avec de l'ADN simple brin ou encore la capacité de translocation sur de l'ADN simple brin de la Pontin n'ont jamais été testées. Cependant, l'interaction avec de l'ADN simple ou double brin et avec de l'ARN simple brin des protéines hPontin purifiées par Matias *et al.* (2006) a été validée expérimentalement. De plus, le domaine DII purifié indépendamment du reste de la protéine interagit avec de l'ADN simple et double brin ainsi qu'avec de l'ARN simple brin (Matias *et al.*, 2006).

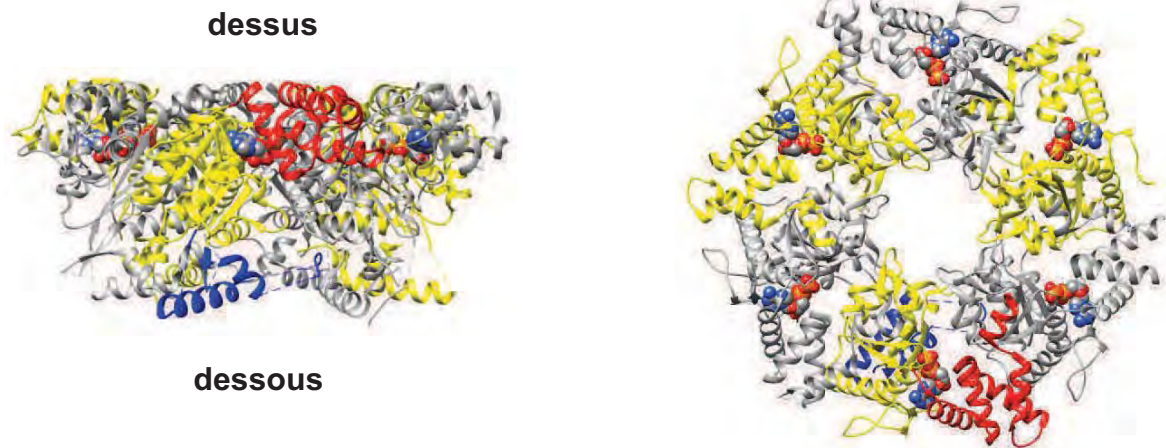
B) Structure cristallographique d'un homo-hexamère de la protéine hReptin:

Récemment, la structure d'un homo-hexamère de la protéine hReptin, tronquée de la région externe du domaine DII (délétion du résidu 131 au résidu 241 remplacée par un lien AGA), que nous nommerons hReptindb2, a été résolue par cristallographie au rayon X (Petukhov et al., 2012) (**Figure 14A**).

1) Structure de la poche catalytique

Comme mentionné lors de la description des monomères de Pontin et de Reptin, les domaines DI et DIII d'un monomère de hReptindb2 ne présentent pas de différences significatives en termes de structure ou de conformation par rapport au monomère de hPontin cristallisé. Il n'est donc pas étonnant que l'anneau formé par les 6 modules AAA+ ne présente pas de différences structurales ou conformationnelles significatives avec celui de l'hexamère de hPontin (**Figure 14B**). Les poches catalytiques renferment une molécule d'ADP et la disposition des différents éléments conservés chez les AAA+ est identique à celle observée pour l'hexamère de hPontin (**Figure 15A**). Il y a deux différences majeures. L'Arg-400 du senseur-2, équivalent de l'Arg-404 pour hPontin, n'est pas entièrement résolue pour aucun des monomères du cristal de hReptindb2. Le doigt arginine potentiel Arg-353 est orienté vers

A.



B.

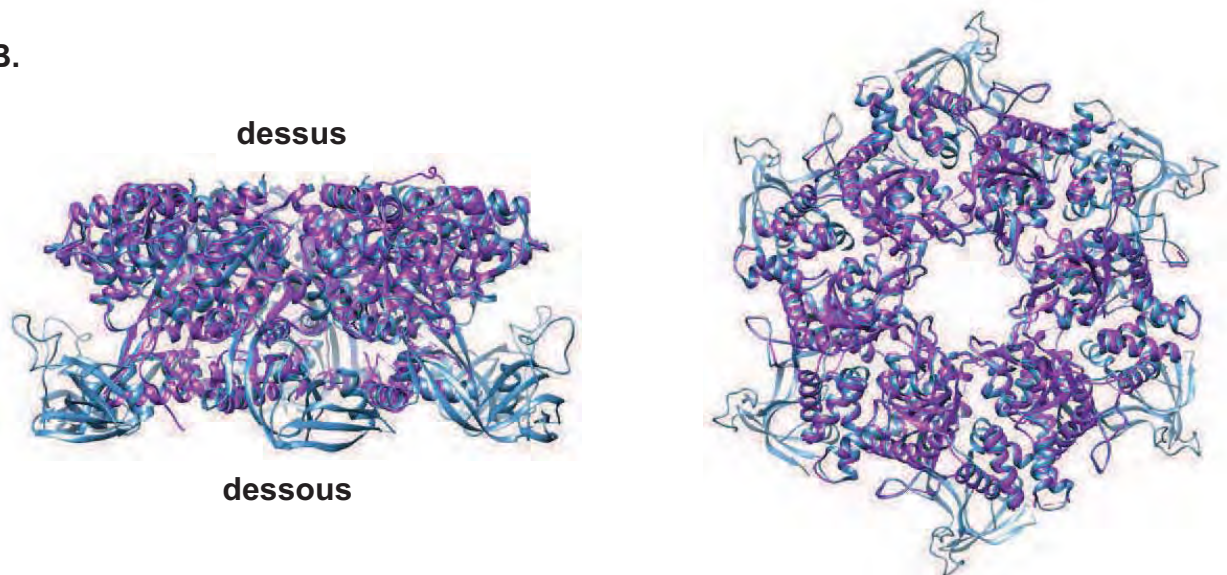


Figure 14. Hexamère de hReptin (Code PDB : 3UK6), comparaison avec l'hexamère de hPontin (Code PDB : 2C9O). **A.** Vue de côté (à gauche) et vue du dessus (à droite) de l'hexamère de hReptin avec la même représentation et le même code couleur que la **Figure 13A**. **B.** Superposition des hexamères de hPontin (en bleu métal) sur celui de hReptin (en violet). Les protomères sont représentés en ruban.

Images et superposition réalisées avec le logiciel Chimera (1.8)
<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

l'extérieur de la poche catalytique contrairement à son équivalent dans l'hexamère de hPontin (l'Arg-357) (**Figure 15A**).

2) Un canal central pour l'accommodation d'ADN double brin

Comme pour l'hexamère de hPontin le diamètre de l'anneau formé par les modules AAA+ est d'environ 120 Å. Par contre, le canal central a un diamètre avoisinant les 25 Å entre les Ca les plus rapprochés. De plus, on retrouve les deux boucles aux entrées supérieure et inférieure du canal central mais leurs charges sont différentes. La boucle à l'entrée inférieure est positive sur hPontin (du résidu 101 au résidu 108) alors qu'elle a perdu une lysine sur hReptin (du résidu 108 au résidu 115) et la boucle située à l'entrée supérieure est négative sur hPontin (du résidu 334 au résidu 351) tandis qu'elle est positive sur hReptin (du résidu 331 au résidu 347). Ceci suggère que l'homo-hexamère de hReptin pourrait accommoder de l'ADN double brin en son centre. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne les propriétés de fixation à l'ADN entre les protéines Pontin et Reptin (Anna Kalashnikova, Odile Humbert, Christophe Papin, Mikhaïl Grigoriev résultats non publiés).

3) Une particularité Reptinienne ?!

Le cristal de Reptindb2 fait apparaître une boucle entre les hélices X et Y de la région interne du domaine DII (Petukhov *et al.*, 2012). Les résidus 257 à 261 de cette boucle sont stabilisés par leur contact rapproché avec le domaine DI et/ou l'hélice X d'un monomère adjacent (**Figure 15B**). Cette boucle n'est pas visible dans le cristal de hPontin indiquant qu'elle peut avoir une fonction spécifique dans les interactions interprotomériques de Reptin. En accord avec cette idée, dans le cristal d'un dodécamère de hPontindb2-hReptindb2 on retrouve une interaction du même type (Gorynia *et al.*, 2011). En effet, dans ce dodécamère la boucle entre les hélices X et Y de Reptindb2 est en interaction avec l'hélice X de Pontindb2 adjacente (voir ci-dessous). Il est également possible que ce soit la délétion de la région externe du domaine DII qui favorise l'interaction de cette boucle avec le protomère adjacent.

C) Hétéro-hexamères *yPontin-yReptin* :

Chez la levure, les hexamères observés sont issus de l'assemblage *in vitro* d'un mélange équimolaire des monomères de yPontin et yReptin recombinantes auquel est ajoutés

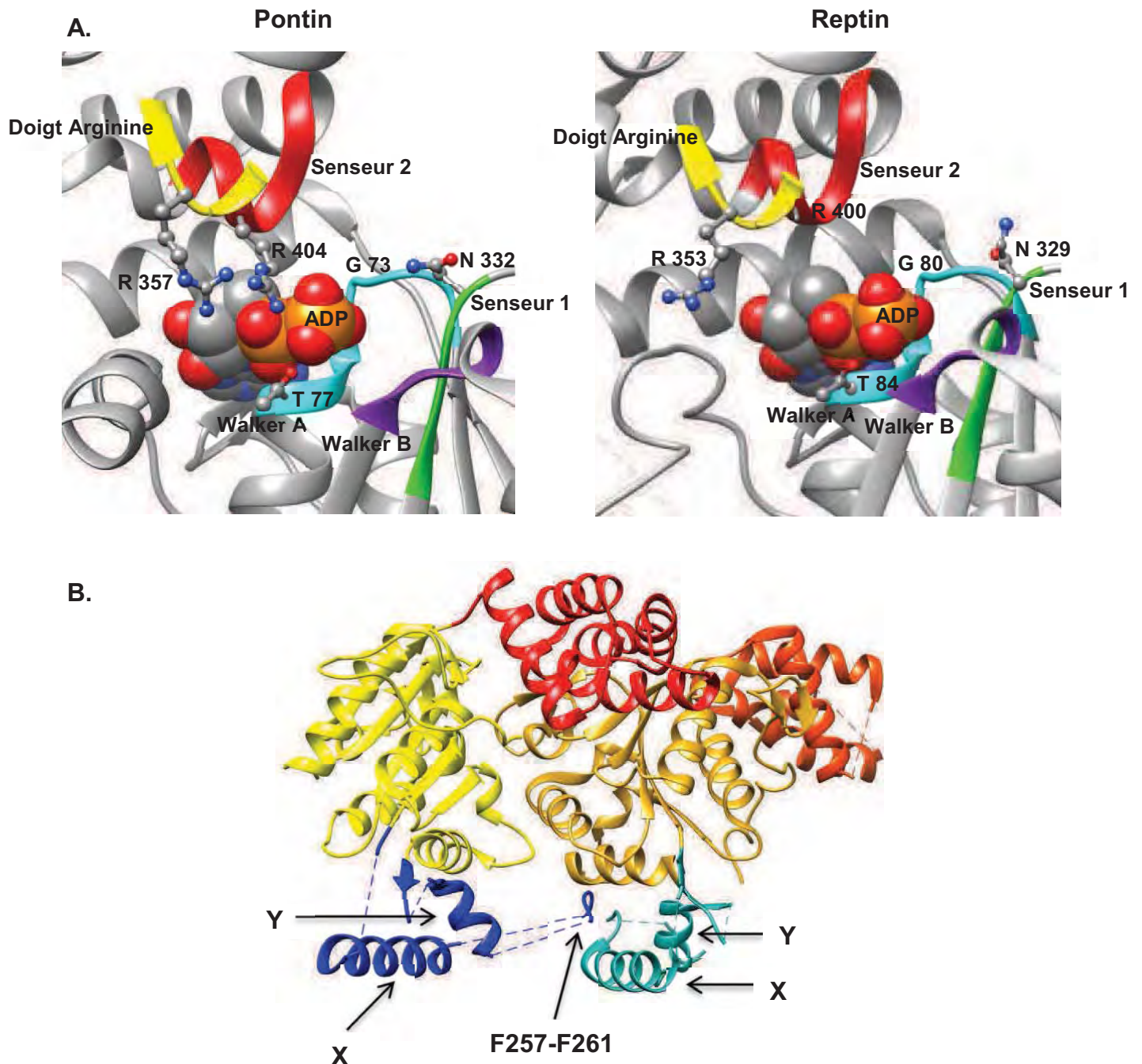


Figure 15. Comparaison des poches catalytiques entre l'hexamère de hPontin (Code PDB : 2C9O) et celui de hReptin (Code PDB : 3UK6) et focus sur la boucle connectant les hélices X et Y. **A.** Comparaison des poches catalytiques de l'hexamère de hPontin (à gauche) avec celle de hReptin (à droite). Le code couleur ainsi que le style de représentation sont les mêmes que ceux utilisés **Figure 13B**. **B.** Représentation de la boucle (257 à 261) située entre les hélices X et Y (indiquées par des flèches) et de son contact rapproché avec un protomère adjacent au sein de l'homo-hexamère de hReptin. Pour faciliter la visualisation, seuls deux protomères adjacents sont représentés en ruban. Le protomère le plus à gauche est représenté avec le même code couleur que la **Figure 12B**. Le protomère le plus à droite est coloré en or pour le domaine I, en cyan pour le domaine II et en orange pour le domaine III.

Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8)
<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

de l'ADP, de l'ATP ou de l'ATP γ S (Gribun *et al.*, 2008). Ce travail étudie la structure bidimensionnelle par microscopie électronique en coloration négative des hexamères ainsi obtenus.

1) Les cofacteurs nucléotidiques entraînent un changement de conformation de l'hétéro-hexamère.

Cette étude permet de visualiser un anneau hexamérique observé par la face supérieure (DI/DIII) qui adopte deux conformations bien distinctes suivant le cofacteur utilisé pour former l'oligomère (**Figure 16**). En présence d'ADP, la structure possède un diamètre d'environ 147 Å et un diamètre du canal central d'environ 17 Å. Etant donné la faible résolution de cette structure, nous pouvons considérer que ces dimensions sont comparables à celles observées pour l'hexamère de hPontin (Matias *et al.*, 2006). Par contre, en présence d'ATP ou d'ATP γ S le diamètre de l'oligomère est d'environ 152 Å et le canal central diminue à environ 15 Å. De plus on peut constater que les particules formées en présence d'ATP ou d'ATP γ S ont des bords concaves qui peuvent être assimilés à une conformation particulière que prend le domaine DII. Ces particules possèdent également 6 zones radiales où le colorant a pénétré contrairement à la particule formée en présence d'ADP. Cette étude met donc en évidence que la présence de cofacteur entraîne un changement de conformation à la fois du module AAA+ mais également du domaine DII.

2) Peut-on vraiment parler d'hétéro-hexamère ?

La faible résolution de cette étude rend impossible l'identification de l'une ou l'autre protéine Pontin et Reptin au sein des différents oligomères observées. Néanmoins, cette équipe propose l'équimolarité entre yPontin et yReptin dans ces complexes par immuno-précipitation avec un anticorps dirigé contre yPontin (Gribun *et al.*, 2008). Toutefois, le gel SDS-PAGE révélé à l'argent permettant d'identifier les protéines capturées montre clairement que la bande correspondant à la protéine yPontin est plus intense que celle correspondant à yReptin. Ainsi, il est toujours envisageable que la protéine yReptin immunoprécipitée provienne d'interactions non-spécifiques entre yPontin et yReptin au sein d'agrégats dans leur échantillon (Cheung *et al.*, 2010 a). Néanmoins, l'observation en microscopie électronique de leurs hexamères marqués par un anticorps dirigé contre yPontin ou yReptin, supporte l'hypothèse que les oligomères observés sont des hétéro-hexamères (Gribun *et al.*, 2008).

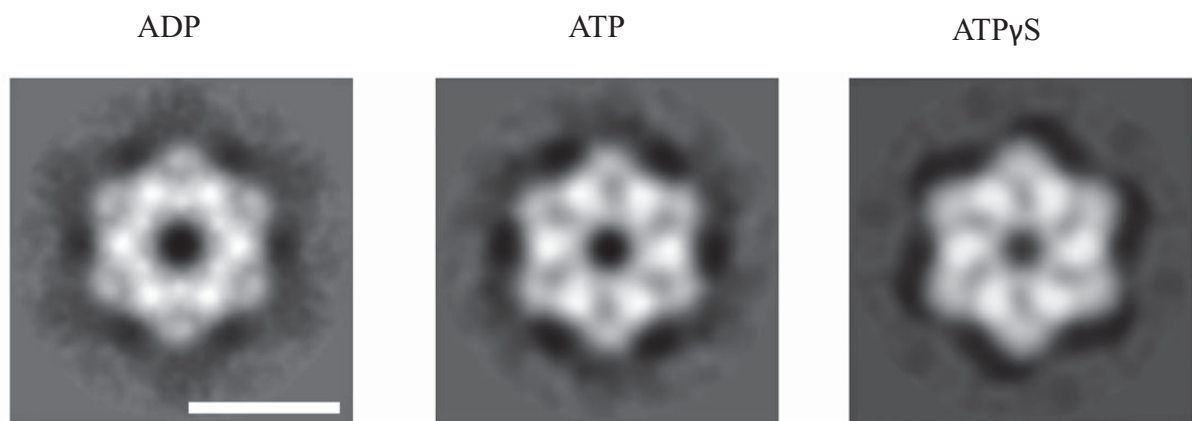


Figure 16. Structures bidimensionnelles de complexes Pontin/Reptin de levure. Moyennes bidimensionnelles de la superposition d'images de microscopie électronique obtenues pour les complexes Pontin/Reptin de levure en présence d'ADP (panneau de gauche), ATP (panneau central) et ATPγS (panneau de droite) (Gribun *et al.*, 2008).

La barre d'échelle représente 100 Å.

Images tirées de Cheung *et al.* (2010) *Biochem Cell Biol.* **88**(1):77-88.

L'assemblage homo-hexamérique est également obtenu avec des protéines recombinantes yPontin ou yReptin (Cheung *et al.*, 2010 ; Gribun *et al.*, 2008) mais la structure de ces complexes n'a jamais été étudiée.

L'assemblage hétéro-hexamérique n'est probablement pas une spécificité des protéines yPontin et yReptin. Pour les protéines humaines, des hexamères issus de l'assemblage de protéines hPontin et hReptin soit *in vitro* (Ikura *et al.*, 2000 ; Niewiarowski *et al.*, 2010) soit par co-expression des deux protéines chez *E.coli* (López-Perrote *et al.*, 2012), ont été observés par chromatographie d'exclusion de taille, ultracentrifugation analytique et/ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en condition native. Ces assemblages n'ont simplement pas fait l'objet d'études structurales.

Que ce soit chez l'homme ou la levure, la présence simultanée des protéines Pontin et Reptin dans un échantillon conduit la plupart du temps à l'assemblage d'un oligomère d'un poids moléculaire avoisinant les 650 kDa (Cheung *et al.*, 2010 b ; Gorynia *et al.*, 2011 ; López-Perrote *et al.*, 2012 ; Niewiarowski *et al.*, 2010 ; Puri *et al.*, 2007 ; Torreira *et al.*, 2008). Comme nous le verrons ci-après, ces complexes correspondent à des dodécamères dont nous allons étudier les caractéristiques les plus marquantes.

III) Structures des dodécamères :

Plusieurs structures de complexes Pontin et Reptin sous forme de dodécamères ont été décrites par reconstitution d'une structure tridimensionnelle à partir d'images de microscopie électronique avec des protéines de levure ou d'homme (Cheung *et al.*, 2010 b ; López-Perrote *et al.*, 2012 ; Puri *et al.*, 2007 ; Torreira *et al.*, 2008). Récemment, un dodécamère d'un complexe de hPontin et de hReptin tronquées de la partie externe de leur domaine DII a été résolu par cristallographie (Gorynia *et al.*, 2011).

D'une manière générale, toutes ces structures dodécamériques présentent une même forme globale en tonneau. On y retrouve toujours deux anneaux présentant une symétrie d'ordre 6 correspondant à l'interaction des modules AAA+. Ces anneaux sont reliés entre eux par des projections protéiques qui correspondent au domaine DII. Ainsi, ces dodécamères correspondraient à l'assemblage de deux hexamères orientés tête-bêche en interaction par les domaines DII.

Néanmoins, toutes ces structures possèdent des caractéristiques conformationnelles qui leurs sont propres, tant pour les anneaux qui les composent que pour les domaines DII. Après une présentation détaillée de la structure la plus résolutive de ces dodécamères (Structure cristallographique d'un dodécamère hPontin-hReptin résolue par Gorynia *et al.* (2011)), je m'attarderai sur les différences majeures que l'on observe pour les autres structures dodécamériques.

A) Structure cristallographique d'un dodécamère hPontin-hReptin :

La structure cristallographique d'un complexe de hPontin et de hReptin a été résolue en 2011 (Gorynia *et al.*). L'assemblage de ce complexe est effectué dans *E.coli* en co-exprimant des formes tronquées de la région externe du domaine DII des protéines hPontin (hPontindb2) et hReptin (hReptindb2). hPontindb2 est tronquée du résidu T127 au résidu E233 et hReptindb2 est tronquée du résidu E134 au résidu E237.

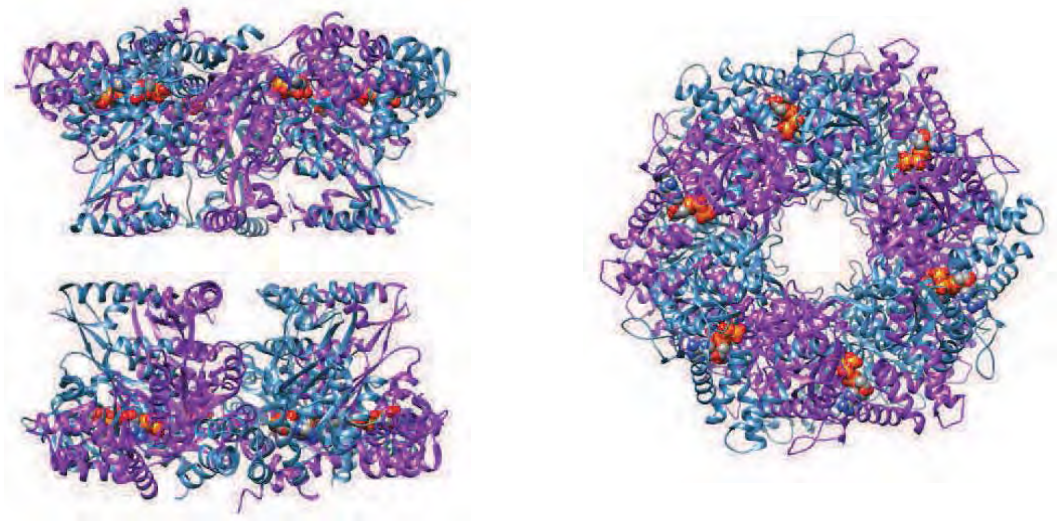
1) Structure global du dodécamère

Le complexe cristallisé est un dodécamère composé de deux hétéro-hexamères empilés l'un sur l'autre (**Figure 17A**). Cette structure a une hauteur d'environ 130 Å et un diamètre maximal de 120 Å au niveau des anneaux formés par les modules AAA+. Chaque hétéro-hexamère est composé d'une alternance de Pontindb2 et de Reptindb2. Les hexamères sont tournés d' $1/12^{\text{ième}}$ de tour l'un par rapport à l'autre de sorte que chaque Pontindb2 et Reptindb2 d'un hexamère fait face à une Pontindb2 et une Reptindb2 de l'autre hexamère. L'interaction entre chaque hexamère se fait au niveau de la partie restante du domaine DII. La structure individuelle des monomères de Pontindb2 et Reptindb2 ne présente pas de différences significatives avec la structure des monomères des cristaux de hPontin (Matias *et al.*, 2006) ou d'un monomère de la structure du cristal de Reptindb2 (Petukhov *et al.*, 2012). Par contre, leur orientation dans le cristal est légèrement différente.

2) Interaction entre les protomères

Cette légère différence d'orientation peut s'expliquer, au moins en partie, par les contacts entre chaque protomère d'un hétéro-hexamère qu'on ne retrouve pas entre les protomères des homo-hexamères. Dans le cristal du dodécamère, la longue hélice α en C-terminal d'un monomère de Reptindb2 est stabilisée par contact avec l'hélice α en C-terminal

A.



B.

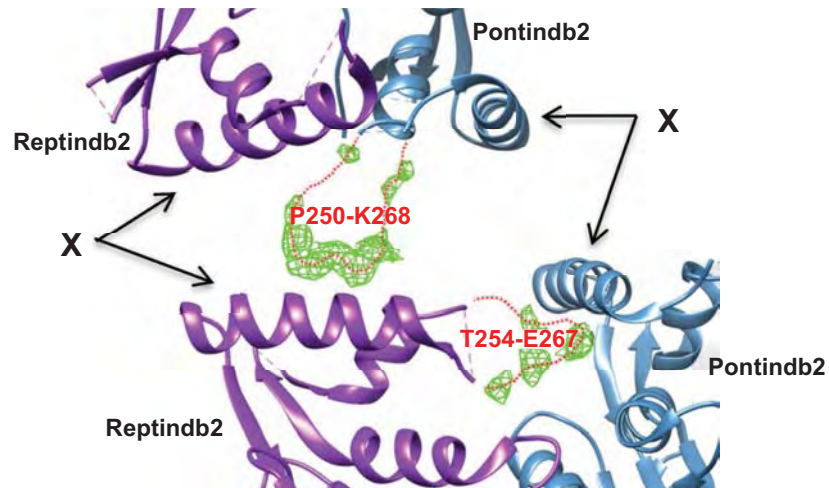


Figure 17. Dodécamère Pontinbd2/Reptinbd2 (Code PDB : 2XSZ) et interaction inter- et intra-anneaux. **A.** Vue de côté (panneau de gauche) et vue du dessus (panneau de droite) du dodécamère Pontinbd2/Reptinbd2. Pontinbd2 et Reptinbd2 sont représentées en ruban et colorées respectivement en bleu métal et violet. Les molécules d'ATP sont représentées en espace de remplissage avec les atomes colorés en gris pour le carbone, rouge pour l'oxygène, bleu pour le nitrogène et orange pour le phosphore. **B.** Interface entre les anneaux du dodécamère Pontinbd2/Reptinbd2. Pontinbd2 et Reptinbd2 sont représentées en ruban et colorées respectivement en bleu métal et violet. Les pointillés rouges représentent les boucles qui n'ont pas pu être modélisées dû à la trop faible densité en électron. La densité en électron finale $|F_0| - |F_c|$ de cette région est schématisée en vert au niveau 2.5σ .

(B) Image modifiée de Gorynia *et al.* (2011) *J. Struct. Biol.* **176**(3):279-91.

Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8) <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

d'une Pontindb2 adjacente. Cette stabilisation semble être due aux résidus chargés négativement sur l'hélice de Reptin (E454, E458 et D461) qui interagiraient avec les résidus chargés positivement sur l'hélice de la Pontin (K441 et K445) (Petukhov *et al.*, 2012). Ces interactions entre la dernière hélice α de Pontin ou de Reptin ne peuvent avoir lieu dans les homo-hexamères puisqu'il n'y a pas d'équivalent du patch acide EED de la Reptin sur la Pontin ni des résidus K-441 et K-445 de la Pontin sur la Reptin. La boucle partiellement résolue connectant les hélices X et Y du domaine DII de la Reptindb2 (résidus T254 à E267) est également impliquée dans les interactions entre les protomères d'un hexamère. Bien que dans le cristal de l'homo-hexamère de hReptindb2 cette boucle interagisse avec le domaine DI, dans le dodécamère cette boucle semble être engagée dans une interaction avec la région N-terminale de l'hélice X de hPontindb2 adjacente au sein du même hexamère (**Figure 17B**).

La structure en dodécamère est stabilisée par la région interne du domaine DII. Comme illustré (**Figure 17B**), deux Pontin ou deux Reptin qui se font face entre les deux hexamères interagissent par l'intermédiaire de la partie C-terminale de leur hélice X. De plus, la boucle partiellement résolue connectant les hélices X et Y (résidus P250 à K268) de Pontindb2 semble interagir avec la région N-terminale de l'hélice X de Reptindb2 qui lui fait face dans l'hexamère opposé.

3) Structure du canal central

Une des conséquences de l'alternance entre Pontin et Reptin apparaît sur l'organisation du canal central. Ce canal présente des dimensions internes allant d'environ 17 Å à environ 21 Å (Gorynia *et al.*, 2011). On retrouve les boucles décrites pour les homo-hexamères mais cette fois-ci, la disposition en alternance des protéines Pontindb2 et Reptindb2 entraîne une répartition du potentiel électrostatique similaire à celle observée pour l'homo-hexamère de la Pontin. L'entrée par la face constituée des modules AAA+ est chargée négativement tandis que l'entrée située au niveau des domaines D2 est chargée positivement (Gorynia *et al.*, 2011). Ainsi, la taille du canal central combinée avec l'alternance du potentiel électrostatique suggère son interaction avec de l'acide nucléique simple brin.

4) Structure de la poche catalytique

La poche de fixation du nucléotide nous réserve, quant à elle, quelques surprises. Bien qu'à aucun moment pendant la purification ou la cristallisation il n'y ait eu d'ajout d'ATP, la

poche catalytique de tous les monomères du cristal présente une densité électronique pour de l'ADP/Mg²⁺ mais également pour de l'ATP, contrairement à l'héxamère (Matias *et al.*, 2006 ; Petukhov *et al.*, 2012) ou seul de l'ADP est présent dans la poche catalytique. Plus précisément, dans les monomères de Pontindb2, la densité électronique au niveau du phosphate γ du nucléotide est beaucoup plus faible que dans les monomères de Reptindb2 suggérant que l'ATP dans les monomères de Pontindb2 est partiellement hydrolysé.

Cette poche catalytique présente la même disposition que dans les homo-hexamères de Pontin (Matias *et al.*, 2006) et Reptindb2 (Petukhov *et al.*, 2012). Tous les motifs conservés de la famille des AAA+, les boîtes Walker A et B et les senseurs-1 et -2 (**Figure 18**), sont dans une configuration similaire à celles observées dans les homo-hexamères. En ce qui concerne les résidus potentiellement impliqués dans des interactions avec le nucléotide, ce cristal comporte deux particularités. Premièrement, l'Arg-357 pour Pontin ou l'Arg-353 pour Reptin, considéré comme le doigt arginine conservé chez les AAA+, est orienté vers l'extérieur de la poche que ce soit pour hPontindb2 ou hReptindb2 comme ce qui était observé dans le cristal de l'homo-hexamère de hReptindb2 (Petukhov *et al.*, 2012). L'interaction entre cette arginine et le phosphate en γ du nucléotide n'est plus possible dans cette conformation. Par contre, il semble qu'il y ait une liaison hydrogène entre l'Asp-356 de Pontin, ou Asp-352 pour Reptin, et ce phosphate en γ . La deuxième différence majeure est la position de l'Arg-400 du senseur-2 pour hReptindb2. Ce résidu n'était pas résolu dans le cristal de l'homo-hexamère de hReptindb2 (Petukhov *et al.*, 2012). Dans le cristal du dodécamère, ce résidu est orienté vers l'extérieur de la poche catalytique.

B) Différentes conformations dodécamériques :

1) Un dodécamère compact

a) Reconstitution tridimensionnelle similaire à la structure cristallographique

L'interaction inter-anneaux par la région interne du domaine DII observé dans le cristal hPontindb2-hReptindb2 (Gorynia *et al.*, 2011) ne semble pas être une conséquence artéfactuelle de l'absence de la région externe du domaine DII. Récemment, une étude par cryo-microscopie électronique d'un complexe formé par les protéines hPontin et hReptin pleine taille a permis la reconstruction tridimensionnelle d'un dodécamère présentant des propriétés similaires au cristal hPontindb2-hReptindb2 (López-Perrote *et al.*, 2012).

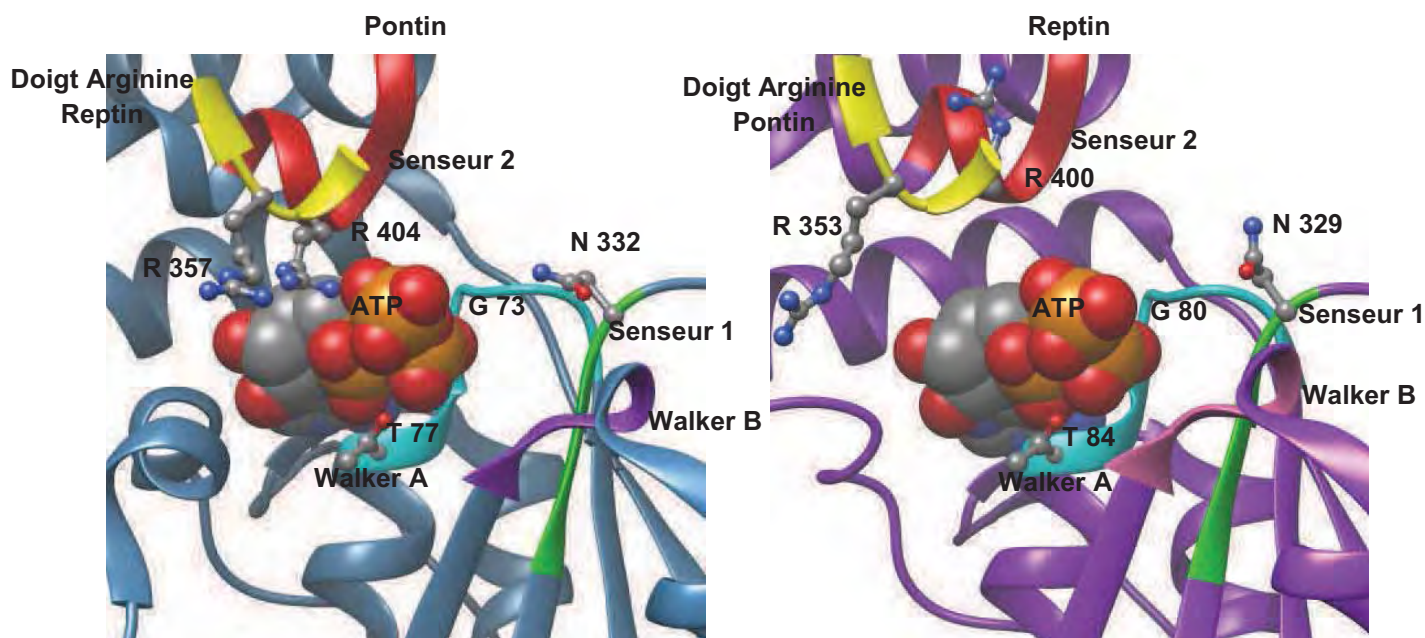


Figure 18. Poches catalytiques du dodécamère Pontinbd2/Reptinbd2 (Code PDB : 2XSZ). Représentation des poches catalytiques du dodécamère Pontinbd2/Reptinbd2. Les protéines sont représentées ruban et colorées en bleu métal pour Pontinbd2 et violet pour Reptinbd2. La région Walker A est colorée en cyan, le Walker B en mauve, la région du senseur 1 est colorée en vert, le senseur 2 est en rouge et le doigt arginine d'un monomère adjacent est coloré en jaune. L'ATP est représentée en sphère de remplissage. Les acides aminés du Walker A G73 et T77 pour Pontin, G80 et T84 pour Reptin, du senseur 1 N332 pour Pontin et N329 pour Reptin, du senseur 2 R404 pour Pontin et R400 pour Reptin et le doigt arginine R357 pour Pontin et R353 pour Reptin sont représentés en billes et bâtons. Les atomes sont colorés en gris pour le carbone, bleu pour le nitrogène, rouge pour l'oxygène et orange pour le phosphore.

Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8)
<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

La carte de densité de ce dodécamère, présenté **Figure 19A et B**, intègre parfaitement la structure cristallographique complète du dodécamère hPontindb2-hReptindb2 (Gorynia *et al.*, 2011). Les six projections de densités volumineuses orientées vers l'extérieur de la structure peuvent être assignées aux régions externes des domaines DII qui ne sont pas présentes dans le cristal du dodécamère.

b) Une conformation rendant l'OB-fold accessible

La bonne résolution de cette reconstitution (16 Å) a permis aux auteurs de placer la structure à l'échelle atomique du domaine DII, résolue pour la protéine hPontin (Matias *et al.*, 2006), dans une seule configuration possible dans les projections latérales (López-Perrote *et al.*, 2012 ; **Figure 19C**). Pour ce faire, ils ont traité ce domaine DII indépendamment des domaines DI et DIII. Ils ont également permis aux régions interne et externe d'être mobiles l'une par rapport à l'autre tout en les maintenant connectées. Ainsi, les régions internes des domaines DII peuvent se placer dans la même configuration que celles observées dans le cristal du dodécamère, c'est-à-dire qu'elles pourraient interagir entre elles d'un anneau à l'autre **Figure 19C**. Les régions externes des domaines DII, quant à elles, peuvent se placer en contact rapproché dans les projections latérales de la structure. Cette configuration semble laisser accessible une grande partie de l'OB-fold. Rappelons que l'OB-fold est une structure connue pour interagir avec des acides nucléiques, des oligosaccharides ou encore des protéines (Arcus, 2002) et nous savons que le domaine DII des protéines Pontin et Reptin peut interagir avec de l'ADN, de l'ARN (Matias *et al.*, 2006), ou encore avec les protéines c-Myc (Wood *et al.*, 2000) ou Hint1 (Weiske et Huber, 2005). Ainsi, cette conformation pourrait permettre aux protéines Pontin et Reptin d'engager des interactions avec des acides nucléiques ou des protéines par l'intermédiaire de cet l'OB-fold.

2) Dodécamères étendus

Toutefois, l'interaction par la région interne du domaine DII entre les deux anneaux du dodécamère et l'orientation de la région externe n'est pas la seule conformation possible pour un assemblage dodécamérique des protéines hPontin-hReptin. En effet, dans la même préparation qui a permis d'obtenir la structure présentée **Figure 19**, les auteurs ont pu reconstituer une seconde structure tridimensionnelle du complexe hPontin-hReptin (López-Perrote *et al.*, 2012).

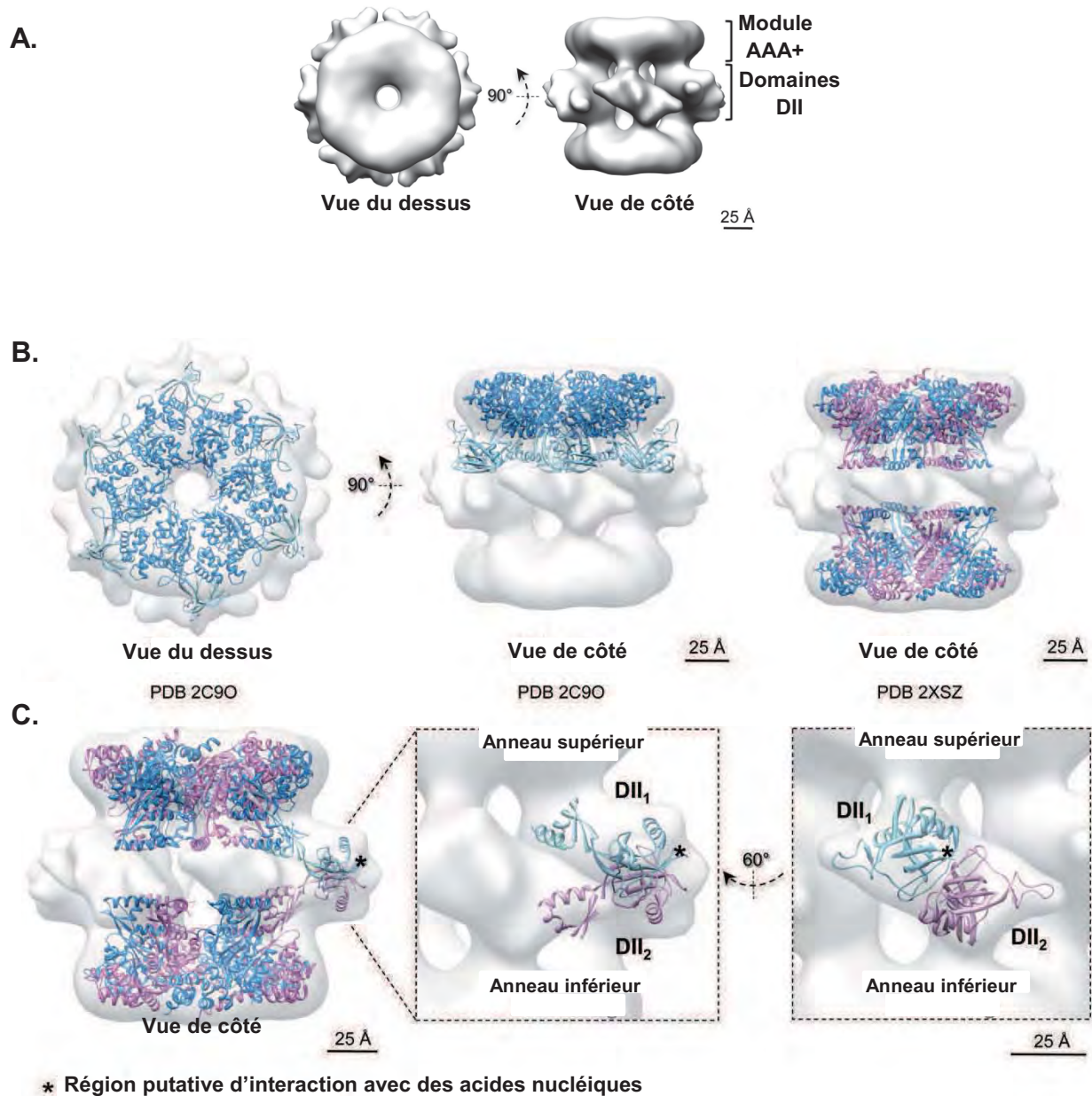


Figure 19. Structure cryo-EM d'un dodécamère hPontin/hReptin compact (Code EMDB : 2163) et modèle pseudo-atomique. **A.** Deux images du complexe hPontin/hReptin en conformation compacte. **B.** Vue du dessus (panneau de gauche) et vue de côté (panneau central) montrant l'intégration de la structure atomique de l'hexamère de hPontin (code PDB : 2C9O, Matias *et al.*, 2006) dans l'anneau supérieur. Vue de côté montrant l'intégration du dodécamère de hPontinbd2/hReptinbd2 (code PDB : 2XSZ, Gorynia *et al.*, 2011) dans la carte de densité du complexe hPontin/hReptin. hPontin est colorée en bleu métal et hReptin en violet. **C.** Le panneau de gauche montre une vue de côté de l'intégration de la structure atomique du dodécamère de hPontinbd2/hReptinbd2 et de l'intégration des domaines II dans la carte de densité. Le panneau central et le panneau de droite montre l'intégration des domaines II (DII₁ pour l'anneau supérieur et DII₂ pour l'anneau inférieur) à la carte de densité après avoir séparé les régions interne et externe. Un astérisque marque les régions putatives des domaines DII impliquées dans l'interaction avec les acides nucléiques.

D'après López-Perrote *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**(21):11086-99.

Cette seconde structure est plus étendue que la précédente. La structure cristalline du dodécamère hPontin-hReptin ne s'intègre dans cette structure qu'à condition d'écarter les deux anneaux hexamériques qui la composent (**Figure 20A et B**). De ce fait, la stabilisation par la région interne du domaine DII n'est plus possible. Cette fois-ci, le dodécamère est stabilisé par la région externe du domaine DII.

- **L'OB-fold n'est plus accessible pour les dodécamères étendus**

Les 6 projections correspondant au domaine DII ne sont pas dans la même conformation que dans le cristal de hPontin (Matias *et al.*, 2006) mais la bonne résolution de cette structure (15 Å) permet de placer ce domaine dans une conformation unique. Par rapport à sa conformation dans le cristal de hPontin (Matias *et al.*, 2006), le domaine DII est légèrement tiré vers l'extérieur du dodécamère et un peu tourné sur l'axe longitudinal. Ceci conduit à une interaction inter-anneaux sur une région située à l'extrémité de l'OB-fold (**Figure 20C**). Contrairement à la structure compacte présentée **Figure 19**, l'OB-fold semble cette fois beaucoup moins accessible laissant supposer que dans cette conformation étendue, l'interaction avec des acides nucléiques ou des protéines doit être limitée.

Chez la levure, on retrouve une structure très similaire à la conformation étendue du dodécamère hPontin-hReptin (**Figure 21**). Ce nouveau dodécamère est obtenu après reconstruction tridimensionnelle d'images de microscopie électronique obtenues pour des oligomères des protéines yPontin et yReptin (Cheung *et al.*, 2010 b). Bien que les deux anneaux qui composent ce dodécamère ne soient pas tout à fait équivalents, ils peuvent loger tous les deux la structure cristallographique de hPontin restreinte aux modules AAA+ de l'hexamère (Matias *et al.*, 2006). Par contre, le domaine DII doit être étiré pour pouvoir s'intégrer dans la carte de densité. A cause de la faible résolution de cette structure (20 Å), la conformation exacte du domaine DII ne peut pas être déterminée. Néanmoins, on peut conclure de façon non ambiguë que ce dodécamère est composé de deux anneaux homo- ou hétéro-hexamériques de yPontin-yReptin dont les domaines DI/DIII doivent être dans une configuration similaire à celles observées dans les cristaux des hexamères de la hPontin (Matias *et al.*, 2006), de la hReptinbd2 (Petukhov *et al.*, 2012) ou du dodécamère hPontin-hReptin (Gorynia *et al.*, 2011). Ces anneaux sont reliés entre eux par contact entre les régions externes des domaines DII dans une conformation étendue. Notons que l'orientation des domaines DII est différente entre la structure présentée ici et la structure étendue proposée par López-Perrote *et al.* (2012). En effet, les domaines DII du dodécamère obtenu par Cheung *et*

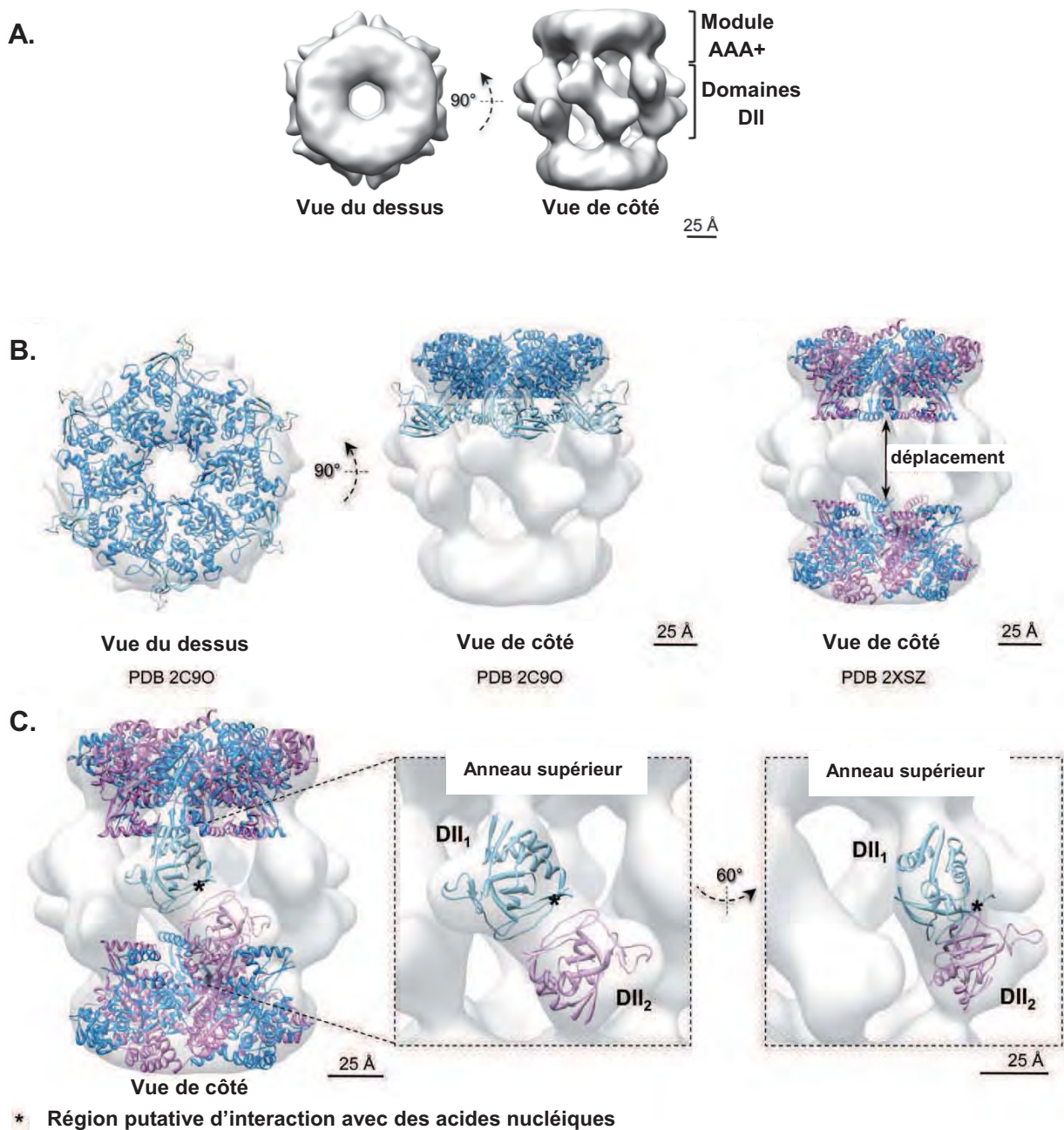


Figure 20. Structure cryo-EM d'un dodécamère hPontin/hReptin étendu (code EMDB : 2164) et modèle pseudo-atomique. **A.** Deux images du complexe hPontin/hReptin en conformation étendue. **B.** Vue du dessus (panneau de gauche) et vue de côté (panneau central) montrant l'intégration de la structure atomique de l'hexamère de hPontin (code PDB : 2C9O, Matias *et al.*, 2006) dans l'anneau supérieur. Vue de côté montrant l'intégration du dodécamère de hPontinbd2/hReptinbd2 (code PDB : 2XSZ, Gorynia *et al.*, 2011) dans la carte de densité du complexe hPontin/hReptin et le déplacement nécessaire à cette intégration. hPontin est colorée en bleu métal et hReptin en violet. **C.** Le panneau de gauche montre une vue de côté de l'intégration de la structure atomique du dodécamère de hPontinbd2/hReptinbd2 et de l'intégration des domaines II dans la carte de densité. Le panneau central et le panneau de droite montre l'intégration des domaines II (DII₁ pour l'anneau supérieur et DII₂ pour l'anneau inférieur) à la carte de densité après avoir séparé les régions interne et externe. Un astérisque marque les régions putatives des domaines DII impliquées dans l'interaction avec les acides nucléiques.

D'après López-Perrote *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**(21):11086-99.

al. (2010 b) présentent une orientation lévogyre tandis que les domaines DII des dodécamères humains compacts et étendus présentent une orientation dextrogyre.

3) Entre une conformation compacte et une conformation étendue

Ces deux types de conformation du domaine DII, compacte et étendue, sont retrouvées dans la structure d'un dodécamère assemblé avec les protéines yPontin et yReptin (**Figure 22**). La structure de ce dodécamère est issue d'une reconstitution tridimensionnelle réalisée à partir d'images de cryo-microscopie électronique (Torreira *et al.*, 2008). Ce complexe a une hauteur d'environ 116 Å et est asymétrique sur le plan équatorial. L'asymétrie est située au niveau de la région où l'on retrouve les domaines DII comme présentés **Figure 22A**. Les domaines DII de l'hexamère supérieur sont beaucoup plus compacts et rapprochés de leur protomère contrairement à la conformation étendue que prennent les domaines DII de l'anneau hexamérique inférieur. Comme pour les différentes structures d'oligomères de Pontin et Reptin obtenues par microscopie électronique, il n'est pas possible de distinguer yPontin de yReptin dans ce complexe. L'expérience de marquage du dodécamère par des anticorps dirigés contre yPontin ou yReptin réalisé par Torreira *et al.*, (2008) supporte l'hypothèse que les anneaux soient des homo-hexamères. La structure complète de l'hexamère de hPontin de Matias *et al.* (2006) ne s'accommode pas dans les deux hexamères qui constituent ce complexe parce que la conformation du domaine DII ne s'intègre pas dans la carte de densité. Par contre, les auteurs ont pu parfaitement intégrer un hexamère des modules AAA+ dans cette structure après avoir effectué une rotation de 5 à 10 degrés vers l'extérieur et dans le sens inverse des aiguilles d'une montre autour de l'axe longitudinal de chaque monomère (**Figure 22B**). Une telle conformation des monomères permet d'élargir le canal central de 18 Å pour l'hexamère cristallisé, à 25 Å pour la structure dodécamérique. Par contre ce réarrangement des monomères au sein des anneaux pose la question de l'intégrité de la poche catalytique, en particulier, de la possibilité du doigt arginine d'être à proximité du nucléotide.

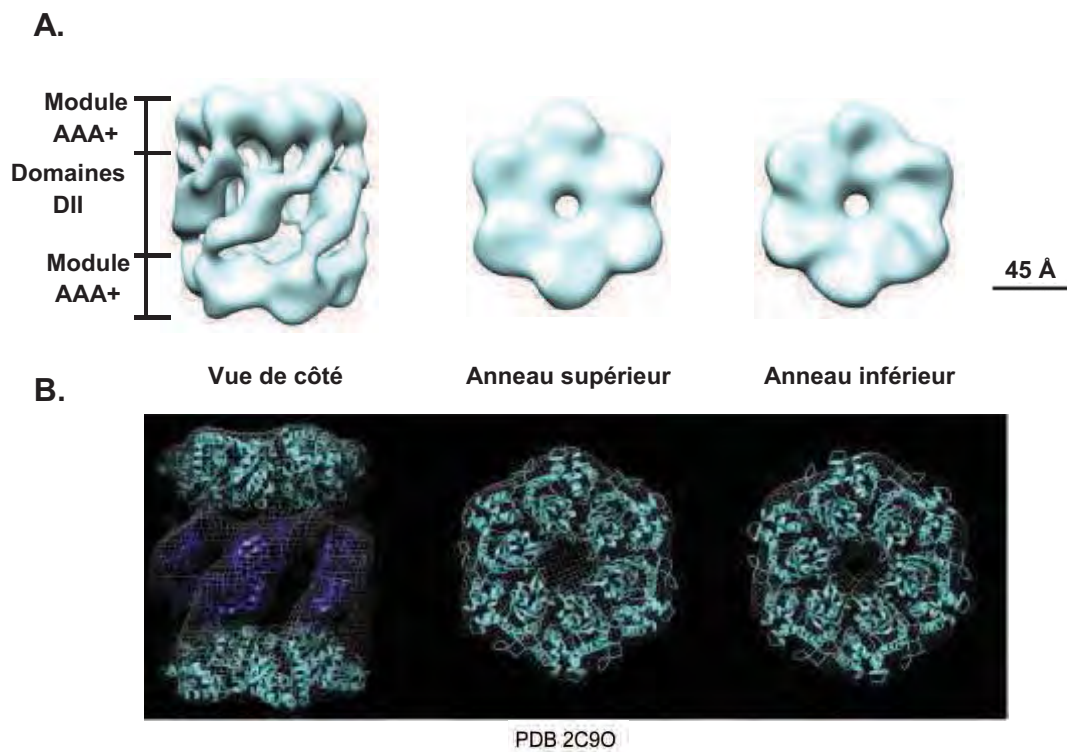


Figure 21. Structure tridimensionnelle d'un dodécamère yPontin/yReptin étendu et modèle pseudo-atomique. **A.** Trois images du complexe yPontin/yReptin. **B.** Vue de face et vue de côté montrant l'intégration de la structure atomique de l'héxamère de hPontin (code PDB : 2C9O) (Matias *et al.*, 2006) dans la carte de densité du complexe yPontin/yReptin (code EMD : 5229). Les domaines II (en bleu foncé) et l'anneau correspondant au module AAA+ (en cyan) sont intégrés à la carte de densité séparément.

D'après Cheung *et al.* (2010) J. Mol. Biol. **404**(3):478-92.

4) Un dodécamère dissymétrique

Une hauteur de 116 Å et un diamètre de canal central d'environ 25 Å ont été observées dans la première structure tridimensionnelle d'un dodécamère humain de Pontin et Reptin (Puri *et al.*, 2007). Ce complexe a été obtenu par reconstitution tridimensionnelle à partir d'images de microscopie électronique à coloration négative d'un complexe assemblé *in vitro* (**Figure 23A**). La caractéristique, sans doute la plus surprenante, de cette structure dodécamérique humaine est sa dissymétrie sur le plan équatorial. En effet, les deux anneaux qui la composent sont significativement différents. L'anneau supérieur présente des ouvertures entre les sous-unités qui le composent tandis que l'anneau inférieur est relativement plat et les sous unités sont bien jointes comme ce que l'on peut observer sur les cristaux de hPontin ou de hReptinbd2. D'ailleurs la structure d'un monomère de hPontin a été placée manuellement dans chacun des deux anneaux (Puri *et al.*, 2007). L'anneau supérieur ne peut pas accommoder la structure de la hPontin par contre l'anneau inférieur accommode raisonnablement le module AAA+ de cette structure. Le domaine DII semble quant à lui devoir subir une rotation d'environ 90° pour obtenir une meilleure adaptation des deux structures.

La résolution ne permet pas d'identifier Pontin et Reptin au sein de ces anneaux mais étant donné que chacune de ces protéines est en quantité équimolaire dans ce complexe et que les anneaux sont très différents, les auteurs émettent l'hypothèse que chaque anneau est un homo-hexamère d'une des deux protéines. Leur proposition s'appuie également sur leur analyse d'assemblage oligomérique de chacune de ces protéines par chromatographie d'exclusion de taille. Bien qu'ils observent que la hReptin s'assemble en un complexe de haut poids moléculaire (~400 kDa) en présence de nucléotides et de Mg^{2+} , la protéine hPontin reste à l'état monomérique. C'est étonnant puisque l'on sait que la protéine hPontin peut former des oligomères allant au moins jusqu'à l'hexamérisation (Matias *et al.*, 2006). Néanmoins, cette analyse par chromatographie suggère que des hexamères de hPontin puissent s'assembler une fois stabilisés sur des hexamères de hReptin préformés.

D'un autre côté, l'hypothèse que ces anneaux soient deux hétéro-hexamères dans deux conformations différentes est aussi valable. En effet, maintenant que la structure cristallographique de hReptin est résolue, on s'aperçoit que l'anneau supérieur n'accommode pas mieux l'hexamère de hReptinbd2 que celui de hPontin. De plus, lorsqu'on compare les projections 2D de ces deux anneaux réalisées par Cheung *et al.* (2010) avec celles des hétéro-

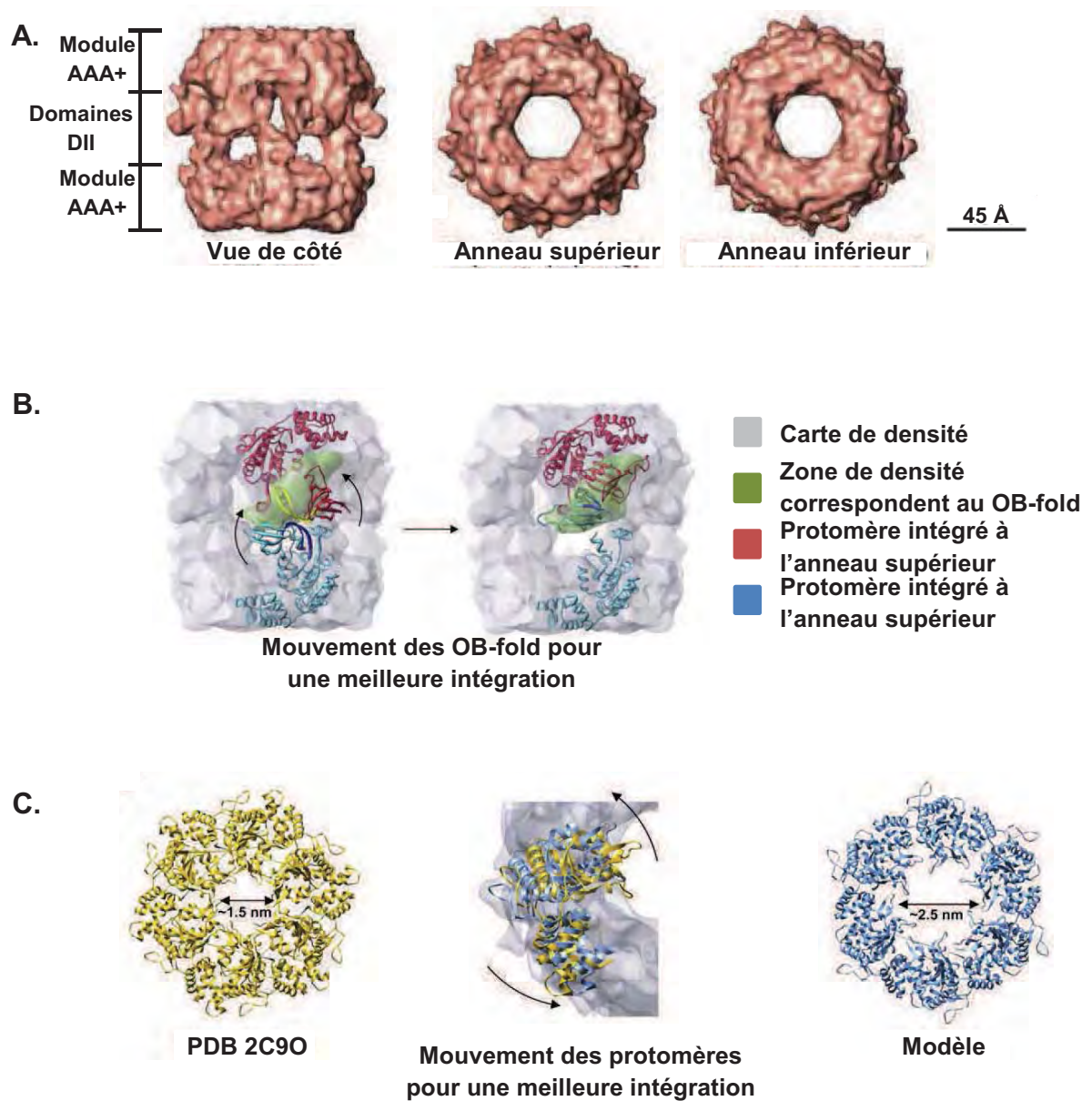


Figure 22. Structure cryo-EM d'un dodécamère yPontin/yReptin étendu et compact (Code EMDB : 2865), et modèle pseudo-atomique. **A.** Trois images du complexe yPontin/yReptin. **B.** Vue de côté montrant l'intégration de la structure atomique de la région externe des domaines II (OB-fold) à la carte de densité. **C.** Vue du dessus montrant l'intégration de la structure atomique de l'hexamère de hPontin (code PDB : 2C9O, Matias *et al.*, 2006) dans l'anneau d'en haut après rotation de chaque protomère.

D'après Torreira *et al.* (2008) Structure. **16(10)**:1511-20.

hexamères de Gribun et ses collaborateurs (2008), on peut supposer que ces anneaux ne renferment pas le même nucléotide (**Figure 23B**). Si on simplifie ces projections 2D en 2 cercles concentriques, le cercle au centre correspondant à l'interaction des 6 modules AAA+ et le cercle extérieur aux domaines DII, alors on peut constater que les cercles du centre de la face supérieure du dodécamère et de l'hétéro-hexamère réalisé avec de l'ATP présentent les mêmes caractéristiques. En fait, on observe des ouvertures entre chaque monomère formant ces anneaux. De la même façon, les cercles du centre de la face inférieure du dodécamère et de l'hétéro-hexamère réalisé avec de l'ADP forment un anneau plein. Les contraintes que subissent les domaines DII dans cette organisation dodecamérique peuvent expliquer les différences observées entre les cercles extérieurs de ces projections 2D.

IV) Et si chaque structure portait une fonction spécialisée

A) Comment expliquer les différences observées entre les différentes structures des protéines Pontin et Reptin?

Les protéines humaines Pontin et Reptin présentent plus de 40% d'identité. Ainsi, il n'est pas surprenant que les monomères présentent des propriétés structurales très similaires. De plus, ces protéines ont également un haut niveau de conservation de la levure à l'homme avec 70% d'identité entre chaque orthologue. De fait, nous observons un certain degré de similarité entre les assemblages oligomériques des protéines humaines comparés à ceux des protéines de levure. Les protéines Pontin et Reptin peuvent s'assembler en anneau homo- ou hétéromérique simple sous la forme d'un hexamère ou double sous la forme d'un dodécamère.

Toutefois, il subsiste quelques différences entre les structures de protéines humaines et celles de levure. Ces différences peuvent être intrinsèquement liées à l'espèce d'où proviennent les protéines Pontin et Reptin. En accord avec cette idée, les délétions des gènes codants pour les protéines Pontin et Reptin chez la levure ne peuvent pas être complémentés par les protéines Pontin et Reptin d'homme, de souris ou de rat (Qiu *et al.*, 1998 ; Lim *et al.*, 2000). Il est donc possible qu'il y ait une vraie différence structurale entre les protéines de levure et de mammifères.

Cependant, il y a parfois plus de différences entre les structures assemblées avec les protéines d'une même espèce qu'entre espèces différentes. Les différences d'oligomérisation

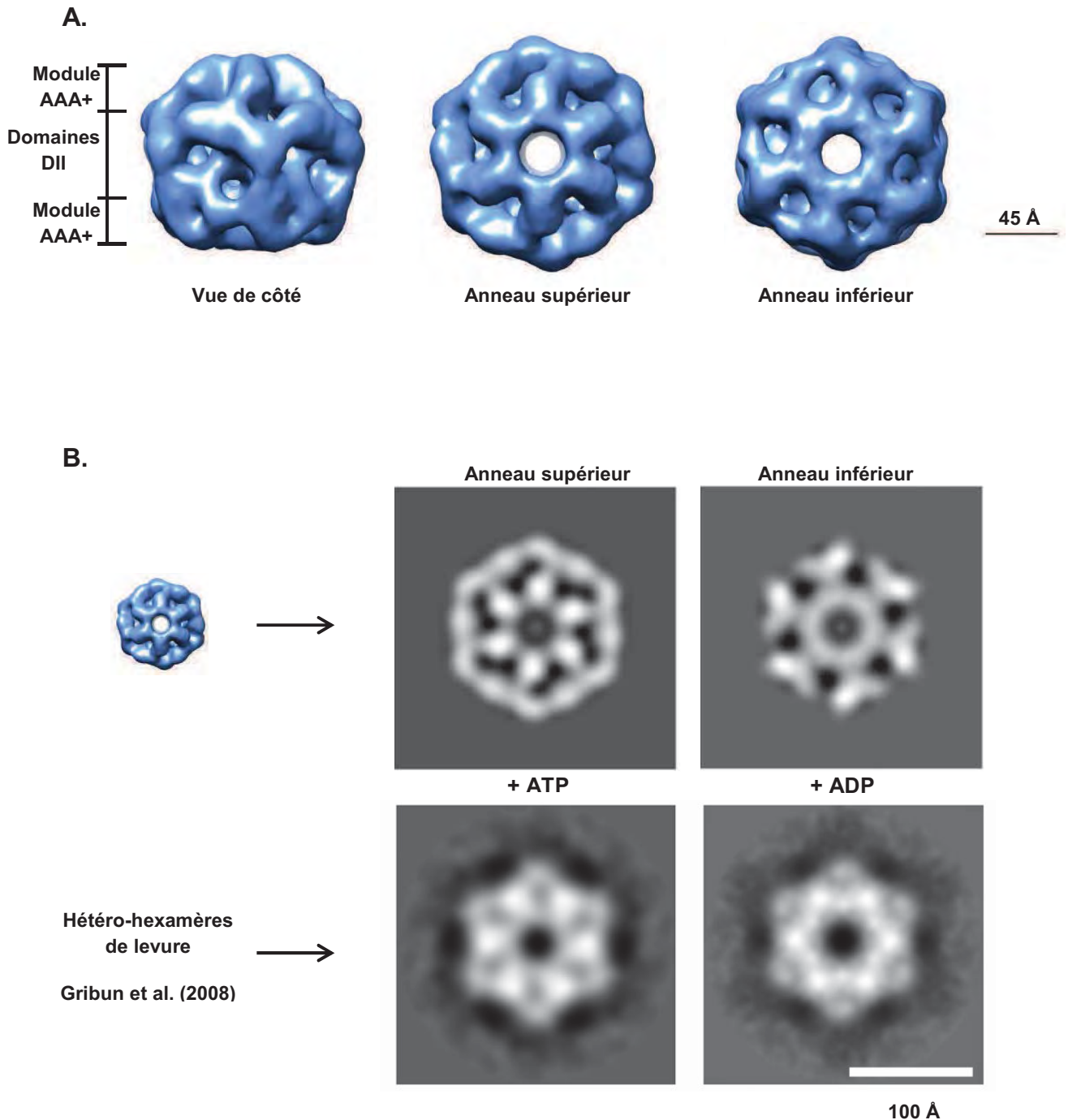


Figure 23. Structure tridimensionnelle du complexe humain Pontin/Reptin (code EMDB : 1317) obtenue par microscopie électronique à coloration négative, et comparaison de projections bidimensionnelles de ce complexe dodécamérique avec celles de l'hétéro-hexamère de levure (Gribun *et al.*, 2008) **A.** Trois images du complexe hPontin/hReptin. **B.** Projection bidimensionnelle des anneaux supérieur et inférieur (définis en **A.**) du complexe hPontin/hReptin humain (Cheung *et al.*, 2010a) et comparaison de ces projections avec les structures bidimensionnelles des hétéro-hexamères de Gribun *et al.* (2008) obtenus soit avec de l'ATP, soit avec de l'ADP.

(A) Images réalisées avec le logiciel Chimera (1.8) <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

(B) Projection bidimensionnelle tirée de (Cheung *et al.*, 2010a) et structures bidimensionnelles des hétéro-hexamères tirées de (Gribun *et al.*, 2008)

et de conformation observées peuvent être simplement dues aux différentes conditions de préparation des protéines telles que la présence ou l'absence de nucléotides ou de Mg^{2+} , l'assemblage *in vitro* ou en cellule par co-expression de protéines, les conditions tampons utilisées (**Tableau 3**).

De plus, chacune de ces structures présente un jeu d'étiquetage des protéines Pontin et Reptin qui lui est propre (**Tableau 3**). Seule l'étude de Gribun *et al.* (2008) présente un complexe hexamérique de yPontin et yReptin non-étiquetées. Cheung *et al.* (2010 b) rapportent que la présence d'une étiquette histidine en N-terminal de yPontin et/ou de yReptin facilite l'assemblage en dodécamère plutôt qu'en hexamère. Parallèlement, les études de Torreira *et al.* (2008) et de López-Perrote *et al.* (2012), présentant des structures de complexes Pontin-N-terminal-His-Reptin et N-terminal-His-Pontin-Reptin respectivement, rapportent que leurs complexes restent stabilisés sous forme d'un dodécamère après avoir retiré l'étiquette. Bien que l'étiquette histidine facilite l'assemblage en dodécamère des protéines Pontin et Reptin, il semblerait qu'elle ne soit pas essentielle à la stabilité du complexe. D'autres études d'assemblage des protéines Pontin et Reptin non-étiquetées sont indispensables pour s'assurer que les étiquettes portées par les protéines n'influencent pas l'assemblage ou la conformation des complexes Pontin et/ou Reptin.

Les différentes conformations observées peuvent être le reflet de la présence de différents cofacteurs dans les poches catalytiques. Pour fournir un travail mécanique, les protéines de la famille AAA+ sont typiquement organisées en oligomères. Ainsi l'engagement de chaque protomère dans une phase du cycle ATPase conduit à des mouvements coordonnés des protomères pour des actions processives tels que le déroulement d'ADN. Bien que les mécanismes mécano-chimiques ne soient pas très bien connus, la communication inter-protomérique a pu être observée pour quelques protéines AAA+ comme l'hélicase virale SV40 LTag (Gai *et al.*, 2004) ou encore la protéase ClpX (Stinson *et al.*, 2013). De tels changements de conformation ont été décrits pour les protéines Pontin et Reptin. Grubun *et al.* (2008) (**Figure 15**) et Torreira *et al.* (2008) observent par microscopie électronique sur des complexes Pontin-Reptin un changement conformationnel certain, dépendant de la présence de cofacteurs.

Ainsi, lorsque l'on classe ces dodécamères du plus compact au plus étendu (**Figure 24**), on ne peut s'empêcher d'imaginer un mouvement des domaines DII qui attirerait et écarterait les anneaux les uns des autres. Ce type de mouvement pourrait refléter l'action








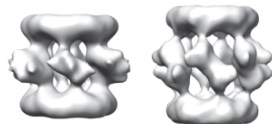
Structure	Conditions tampons	Nucléotide ajouté	Construction/Assemblage	Système d'expression
Hexamère hPontin (Matias <i>et al.</i> , 2006) 	20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol	ADP	N-His-FLAG-Pontin	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Dodécamère humain (Puri <i>et al.</i> , 2007) 	20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA	Pas de nucléotide ajouté	Pontin/Reptin-His-C/ <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Hétéro-hexamères de levure (Gribun <i>et al.</i> , 2008) 	25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol	ADP, ATP and ATPγS	Pontin/Reptin/ <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Dodécamère de levure (Torreiria <i>et al.</i> , 2008) 	25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 125 mM NaCl	Pas de nucléotide ajouté	Pontin/N-His-Reptin/ <i>in vivo</i>	Baculovirus
Dodécamère de levure (Cheung <i>et al.</i> , 2010b) 	25mM Tris-HCl, pH 7.5, 80mM KCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol	ADP	N-His-Pontin/Reptin/ <i>in vitro</i> Pontin/ N-His-Reptin/ <i>in vitro</i> N-His-Pontin/N-His-Reptin/ <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Hétéro-dodécamère humain (Gorynia <i>et al.</i> , 2011) 	20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 4 mM MgCl ₂ , 0.5 mM tris(2- carboxyethyl)phosphine	ADP	N-His-Pontindb2/N-FLAG-Reptindb2/ <i>in vivo</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Hexamère hReptin (Petukhov <i>et al.</i> , 2012) 	100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% PEG 3000, 5% glucose	ADP	Reptindb2-His-C/ <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> BL21- Gold (DE3)
Dodécamère humain (López-Perrote <i>et al.</i> , 2012) 	50mM Tris-HCl pH 7.4, 250mM NaCl	Pas de nucléotide ajouté	N-His-Pontin/Reptin/ <i>in vivo</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)

Tableau 3. Conditions tampons utilisées, constructions protéiques et systèmes d'expressions utilisés pour les analyses structurales des protéines Pontin et/ou Reptin.

processive de ces protéines sous cette forme oligomérique. Les différentes structures dodécamériques proposées seraient le reflet de l'enrichissement d'un intermédiaire conformationnel en conséquence des différentes conditions de préparation du complexe. En accord avec cette hypothèse, la structure proposée par Torreira *et al.* (2008) n'est reconstruite qu'à partir d'environ 34 % des objets présents dans l'échantillon. Les 66 % de particules restantes n'ont pas pu être classifiées afin de proposer une structure suffisamment résolutive. L'élimination de 66 % d'objets dans cette préparation supporte l'idée que plusieurs conformations de dodécamères Pontin-Reptin peuvent co-exister.

Etrangement, López-Perrote *et al.* (2012) n'observent aucun changement ni dans la conformation, ni dans la façon dont les protéines Pontin et Reptin se présentent sur une grille de microscopie électronique lorsque ces complexes sont incubés avec ou sans ADP ou analogues d'ATP. Notons que les complexes purifiés par Torreira *et al.* (2008), López-Perrote *et al.* (2012), Gorynia *et al.* (2011), Matias *et al.* (2006) et Petukhov *et al.* (2012) sont assemblés dans leur système d'expression. Or, même sans ajout de nucléotides, les protéines Pontin ou Reptin co-cristallisent avec de l'ADP ou de l'ATP (Gorynia *et al.*, 2011 ; Matias *et al.*, 2006 ; Petukhov *et al.*, 2012). Il est donc tout à fait envisageable que les complexes obtenus par López-Perrote *et al.* (2012) possèdent déjà des nucléotides dans leurs poches catalytiques mais que l'échange ou le relargage de ces nucléotides est trop faible pour observer un quelconque effet sur la conformation de ces complexes. D'autant plus que dans cette étude ils ne testent pas l'activité enzymatique de leurs complexes. Si leurs structures sont inactives, figées dans une conformation qui empêche l'échange ou l'entrée de cofacteurs dans la poche catalytique, il est normal de ne pas observer de changements de conformation en présence de cofacteurs nucléotidiques différents. A ce stade, il paraît nécessaire de travailler avec les protéines Pontin et Reptin purifiées indépendamment pour reconstruire les oligomères avec ou sans cofacteurs nucléotidiques afin d'étudier l'impact de ces cofacteurs sur la conformation des assemblages oligomériques des protéines Pontin et Reptin.

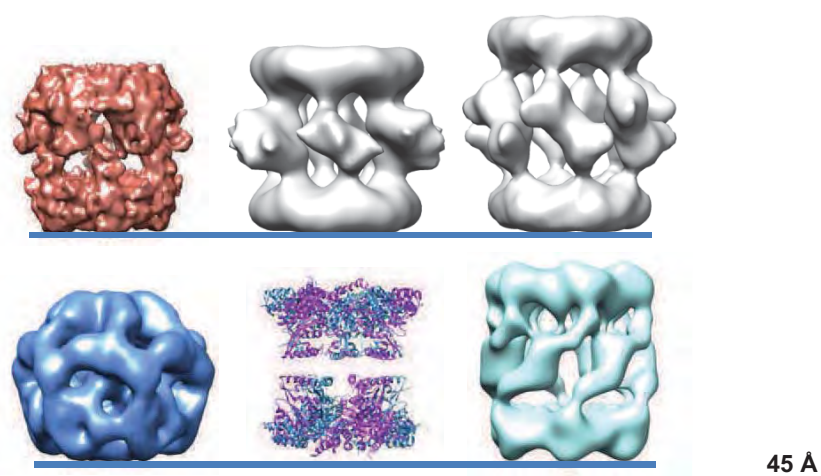


Figure 24. Alignement des différentes structures dodécamériques des complexes Pontin/Reptin, de la forme la plus compacte à la plus étendue. Sur la ligne supérieure, de gauche à droite (Torreira *et al.*, 2008), (López-Perrote *et al.*, 2012). Sur la ligne inférieure, de gauche à droite (Puri *et al.*, 2007), (Gorynia *et al.*, 2011) et (Cheung *et al.*, 2010 b).

B) Chaque niveau d'assemblage oligomérique porte des activités enzymatiques qui lui sont propres.

1) Une enzymologie controversée

A l'image des différentes structures proposées pour les protéines Pontin et Reptin, la littérature contient des résultats controversés en ce qui concerne les activités d'hydrolyse de l'ATP et de déroulement d'ADN ATP-dépendent des protéines Pontin et Reptin. Cette controverse vient probablement du fait que lorsque l'enzymologie des protéines Pontin et Reptin est évaluée, l'état oligomérique des protéines n'est que trop peu pris en compte (Choi *et al.*, 2009 ; Gorynia *et al.*, 2011 ; Kanemaki *et al.*, 1999 ; Makino *et al.*, 1999 ; Qiu *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2011). Or, Gribun *et al.* (2008) observent que les protéines yPontin et yReptin s'assemblent en homo-hexamères de façon « concentration dépendante », indépendamment de la présence de cofacteurs nucléotidiques. De plus, tous les homo-hexamères étudiés ne présentent ni activité ATPase ni activité hélicase (Elkaim *et al.*, 2012 ; Matias *et al.*, 2006 ; Papin *et al.*, 2010). Il est donc dangereux d'étudier l'enzymologie des protéines Pontin et Reptin sans évaluer la nature oligomérique de l'échantillon testé.

Ainsi, il est proposé que la protéine yPontin ne présente ni activité ATPase ni activité hélicase (Gorynia *et al.*, 2011 ; Qiu *et al.*, 1998). Choi *et al.* (2009) n'observent une activité ATPase que lorsque les protéines hPontin et hReptin sont mélangées. L'équipe de Tamura, quant à elle, a mis en évidence, pour les protéines rPontin (Kanemaki *et al.*, 1999) et hReptin (Makino *et al.*, 1999), une activité ATPase induite spécifiquement par de l'ADN simple brin et une activité hélicase 3' vers 5' pour rPontin et 5' vers 3' pour hReptin. Plus récemment chez le riz, la Reptin possède une activité ATPase également spécifiquement induite par de l'ADN simple brin et une activité hélicase de 3' vers 5' (Wang *et al.*, 2011).

2) La controverse est levée lorsque l'on s'intéresse au niveau d'assemblage oligomérique des protéines Pontin et Reptin

Comme pour l'essentiel des protéines de la famille AAA+, l'état oligomérique des protéines a une influence non-négligeable sur les propriétés enzymatiques de cette famille de protéines. C'est probablement pourquoi les études réalisées avec des états oligomériques bien définis apparaissent beaucoup plus cohérentes. Sous leur forme monomérique, les protéines humaines Pontin et Reptin possèdent une activité ATPase stimulée par la présence d'ADN spécifiquement simple brin pour la Reptin (Papin *et al.*, 2010) ou simple et double brin pour

la Pontin (Elkaim *et al.*, 2012). Chez la levure, les monomères de Pontin (Gribun *et al.*, 2008) et de Reptin (Gribun *et al.*, 2008 ; Papin *et al.*, 2010) possèdent une activité ATPase dont seul Papin *et al.* (2010) concluent qu'elle soit spécifiquement induite en présence d'ADN simple brin. Il est possible que les préparations de Gribun *et al.* (2008) contiennent de l'ADN d'*E.coli* empêchant d'observer une stimulation par de l'ADN. Ceci dit, bien que la vitesse initiale de l'hydrolyse d'ATP ne change pas significativement en présence d'ADN, l'hydrolyse en elle-même est permise sur des temps d'incubation beaucoup plus long lorsqu'ils ajoutent de l'ADN dans le mélange réactionnel (Gribun *et al.*, 2008). Ceci indique que les protéines yPontin ou yReptin doivent interagir avec l'ADN et que cet ADN doit fonctionnellement aider les protéines à hydrolyser l'ATP. Puri *et al.* (2007) n'ont pas observé d'activité ATPase pour les protéines hPontin et hReptin sous leurs formes monomériques mais ils n'ont pas testé si l'ADN pouvait stimuler cette activité ATPase. En ce qui concerne l'activité hélicase, les protéines de levure Pontin (Gribun *et al.*, 2008) et Reptin (Gribun *et al.*, 2008 ; Papin *et al.*, 2010) possèdent une activité hélicase dont Papin *et al.* (2010) établissent pour yReptin la directionnalité de 3' vers 5'. Chez l'homme, la Reptin possède également une activité hélicase de 3' vers 5' (Papin *et al.*, 2010).

Présenté ainsi, il semble évident que les protéines Pontin et Reptin possèdent, à l'état monomérique, une activité ATPase stimulée par de l'ADN et une activité hélicase ATP-dépendante.

Quel est la part de l'ADN dans l'assemblage oligomérique des protéines Pontin et Reptin ? Jusqu'à ce jour aucune étude sur l'implication de l'ADN dans l'assemblage oligomérique ou sur les changements conformationnels des protéines Pontin et Reptin n'a été réalisée. Chez la levure, les monomères de Pontin et Reptin ne peuvent former des oligomères seulement lorsqu'elles sont en concentration élevée (Gribun *et al.*, 2008). De plus, chez l'homme, les monomères de Pontin ne forment pas d'hexamère même en présence d'ADP ou d'ATP (Puri *et al.*, 2007 ; Niewiarowski *et al.*, 2010). De façon intéressante, Papin *et al.* (2010) montrent que les protéines Reptin humaine et de levure fixent de façon coopérative de l'ADN simple brin d'une taille minimale de 30 nucléotides. Cette taille est compatible pour tenir 6 monomères ensemble. La formation d'hexamères pourrait donc passer par l'assemblage des monomères sur l'ADN afin de rapprocher les monomères et de préparer la poche catalytique pour qu'ils puissent hydrolyser de l'ATP ou enfermer de l'ADP.

Comme mentionné ci-dessus, les formes homo-hexamériques des protéines humaines Pontin (Elkaim *et al.*, 2012 ; Matias *et al.*, 2006) et Reptin (Papin *et al.*, 2010) sont toutes inactives en ATPase et en hélicase. Par contre, (Gribun *et al.*, 2008) observe une activité ATPase stimulée par de l'ADN simple brin ainsi qu'une activité hélicase ATP-dépendante de 3' vers 5' avec un hétéro-hexamère composé des protéines yPontin et yReptin.

Le mélange des protéines Pontin et Reptin sous forme dodécamérique (Niewiarowski *et al.*, 2010 ; Puri *et al.*, 2007 ; Torreira *et al.*, 2008) ou dans un complexe d'environ 500 kDa (Ikura *et al.*, 2000), possède une activité ATPase ADN indépendante considérée comme plus élevée que celle des protéines non structurées en dodécamère. Il est difficile d'admettre que ces complexes sont plus efficaces que les monomères dans ces expériences puisque soit ces études ne prennent pas en compte l'ajout d'ADN avec les monomères (ou dimères/trimères pour hReptin dans l'étude d'Ikura *et al.* (2000)) (Ikura *et al.*, 2000 ; Puri *et al.*, 2007), soit ils étudient un mélange des restes de protéines Pontin et Reptin qui ne se sont pas assemblées pendant leur protocole d'assemblage oligomérique (Niewiarowski *et al.*, 2010 ; Torreira *et al.*, 2008) et ce, toujours sans ajouter de l'ADN. En ce qui concerne l'activité hélicase, seul le complexe d'environ 500 kDa d'Ikura *et al.* (2000) a été évalué et il ne possède pas d'activité hélicase.

Au vu du nombre et de la diversité des processus cellulaires pour lesquels les protéines Pontin et Reptin ont été fonctionnellement impliquées, il est envisageable que les anneaux simples soient impliqués dans un processus cellulaire donné et que les anneaux doubles le soient dans un autre. Illustrant cette idée, un groupe canadien a isolé les protéines yPontin et yReptin dans un de leurs complexes associés, le complexe R2TP (Cheung *et al.*, 2010 b). Ce complexe joue un rôle chaperon pour l'assemblage des snoRNPs (small nucleolar ribonucleoproteins) (Boulon *et al.*, 2008 ; Machado-Pinilla *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2005), le maintien de la stabilité des protéines de la famille PIKK (pour « PhosphatidylInositol 3-Kinase-related protein Kinases ») (Izumi *et al.*, 2010) et également pour l'assemblage cytoplasmique de l'ARN polymérase II (Boulon *et al.*, 2010). Il comprend deux cofacteurs de Hsp90, PIH1D1 et RPAP3, qui interagissent avec les protéines Pontin et Reptin. Par électrophorèse en gel natif et microscopie électronique, ce groupe (Cheung *et al.*, 2010 b) démontre que les protéines Pontin et Reptin sont assemblées en hexamère au sein de ce complexe et que cet hexamère n'est pas distinguable de l'hétéro-hexamère qu'ils reconstituent *in vitro* (Cheung *et al.*, 2010 b).

Très récemment, deux études indépendantes viennent d'apporter la preuve que les protéines Pontin et Reptin peuvent exister sous différents assemblages oligomériques suivant le complexe auquel elles sont associées (Nguyen *et al.*, 2013 ; Tosi *et al.*, 2013). Ces études se sont intéressées à la structure de deux complexes de remodelage de la chromatine contenant les protéines Pontin et Reptin, les complexes INO80 (Tosi *et al.*, 2013) et SWR1 (Nguyen *et al.*, 2013). Ainsi, après purification de ces complexes chez la levure, les auteurs ont reconstruit leur structure tridimensionnelle à partir d'images de cryo-microscopie électronique couplées à l'analyse par spectrométrie de masse de produits de digestion trypsique, générés dans des expériences de protéolyse ménagée, de leur complexe cross-linké. La structure du complexe INO80 obtenue par Tosi *et al.* (2013) révèle que les protéines yPontin et yReptin sont associées au complexe INO80 sous forme d'un hétéro-dodécamère (Tosi *et al.*, 2013). Ce résultat confirme une étude préalable qui estimait que le complexe INO80 contenait six Pontin et six Reptin pour une des autres protéines de ce complexe (Shen *et al.*, 2000). Par contre, au sein du complexe SWR1 les protéines yPontin et yReptin sont retrouvées sous forme d'un hexamère (Nguyen *et al.*, 2013). Par contre, cette dernière étude ne permet pas de confirmer s'il s'agit d'un hétéro-hexamère ou si la reconstruction tridimensionnelle a été obtenue à partir de deux complexes de SWR1, l'un contenant un homo-hexamère de Pontin et l'autre contenant un homo-hexamère de Reptin. Notons que Nguyen *et al.* (2013) ont également purifié un complexe INO80 mais contrairement à Tosi *et al.* (2013) et Shen *et al.* (2000), ils estiment que la stoechiométrie des protéines Pontin et Reptin dans ce complexe était de trois pour une des autres protéines du complexe, laissant suggérer que les protéines Pontin et Reptin soient associées en hétéro-hexamère dans leur complexe INO80 (Nguyen *et al.*, 2013). Cette divergence peut être le reflet de différentes méthodes de purifications des complexes conduisant, dans certains cas, à la déstabilisation du dodécamère de Pontin et Reptin de sorte qu'il ne subsiste qu'un hexamère. Toutefois, nous pouvons également considérer que les macro-complexes INO80, et potentiellement SWR1, puissent posséder différents niveaux d'assemblages protéiques comprenant soit un dodécamère soit un hexamère de Pontin et Reptin.

Etant donnée la variété de fonctions associées aux protéines Pontin et Reptin en complexe, mais également individuellement (Bauer *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2005 ; Rottbauer *et al.*, 2002), les homo-hexamères voire même les mono-, di- et trimères peuvent également avoir une fonction propre *in vivo*.

Partie 2 : Résultats

I) Article : REPTIN AND PONTIN FUNCTIONS ARE DIRECTED BY H3-TAIL INTERACTION AND MODIFICATION

A) Question posée et démarches expérimentales

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, les protéines AAA+ Pontin et Reptin ont été décrites dans de nombreux complexes multiprotéiques aux fonctions très diverses, comme les complexes INO80, SRCAP, TIP60, la télomérase, le complexe R2TP ou encore le complexe γ TuRC. De plus, elles sont également des co-facteurs essentiels aux activités transcriptionnelles de plusieurs facteurs de transcriptions. Comme composants majeurs de ces complexes, les protéines Pontin et Reptin sont essentielles *in vivo*, chez les eucaryotes, dans de nombreux processus cellulaires comme le remodelage de la chromatine, la transcription, la stabilité génomique, la biogenèse des RNPs ou la division cellulaire. Pour l'ensemble de ces raisons, les protéines Pontin et Reptin ont fait l'objet d'un grand intérêt scientifique ces dernières années. Pour autant leur rôle exact dans l'ensemble de ces complexes reste inconnu à ce jour.

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a apporté des informations significatives sur les propriétés biochimiques des protéines Pontin (résultats non publiés) et Reptin (Papin *et al.*, 2010), représentant un point de départ nécessaire pour envisager la fonction de ces protéines *in vivo*. Ils ont montré que Pontin et Reptin, à l'état monomérique, se lient à l'ADN. Ils ont aussi découvert que la présence d'ATP induit une faible activité ATPasique dépendante de l'ADN, et une activité de déroulement de l'ADN, lente et peu processive. De plus, l'accumulation d'ADP dû à l'hydrolyse de l'ATP conduit à une hexamérisation de Pontin et Reptin, une structure oligomérique stable, mais enzymatiquement inactive.

Ces résultats indiquent que les activités, ATPase et hélicase, des protéines Pontin et Reptin sont dépendantes de l'ADN. Cette dépendance envers l'ADN couplée au rôle essentiel de ces protéines dans la fonction de complexes de remodelage de la chromatine nous ont conduit à émettre l'hypothèse que leurs fonctions biologiques, au sein de ces complexes, soient régulées par la forme structurée de l'ADN *in vivo*, le nucléosome.

Cette hypothèse implique que les protéines Pontin et Reptin puissent interagir, tant physiquement que fonctionnellement, avec les nucléosomes. Ainsi, pendant ma thèse, nous avons posé les bases moléculaires des interactions entre les protéines Pontin et Reptin et le

nucléosome. Pour cela, nous avons étudié l'affinité de ces protéines pour les nucléosomes et pour les histones, portant ou non des modifications post-traductionnelles. Nous nous sommes intéressés à l'impact que peuvent avoir ces histones et leurs modifications sur les propriétés biochimiques des protéines Pontin et Reptin, tant sur leurs activités ATPases et hélicases que sur leur capacité à s'oligomériser. Et enfin, nous avons évalué le rôle que peuvent avoir ces interactions sur les fonctions biologiques des protéines Pontin et Reptin.

B) Résultats

Nos résultats sont présentés dans le manuscrit ci-après : « Reptin and Pontin functions are directed by H3-tail interaction and modification ».

Résumé des résultats :

Cette étude *in vitro* nous a permis de montrer que les protéines Pontin et Reptin forment un complexe stable avec des mono-nucléosomes, lequel dépend de la région N-terminale de l'histone H3. Nous montrons que l'activité ATPase ADN-dépendante des protéines Pontin et Reptin est modulée différemment par l'extrémité N-terminale d'H3, suivant qu'elle porte ou non des modifications post-traductionnelles. Corrélié à cela, ces mêmes extrémités N-terminales d'H3 régulent l'état d'oligomérisation des protéines Pontin et Reptin. De plus, le profil des protéines co-immuno-precipitées avec les monomères de Pontin et Reptin diffère de celui obtenu avec les formes hexamériques. Nous proposons que les protéines Pontin et Reptin constituent une plateforme moléculaire de recrutement pour des facteurs protéiques, et, au-delà, coordonnent ce recrutement par des changements de leurs états oligomériques, eux-mêmes régulés par leurs interactions avec la région N-terminale de l'histone H3.

REPTIN AND PONTIN FUNCTIONS ARE DIRECTED BY H3-TAIL INTERACTION AND MODIFICATION

Richard Queval^{1,2}, Christophe Papin³, Mathieu Dalvai^{1,2}, Kerstin Bystricky^{1,2} and Odile Humbert^{1,2*}

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, CNRS/UMR 5099, 31062 Toulouse Cedex, France

²Université de Toulouse, UPS, 31062 Toulouse Cedex, France,

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch Cedex, France

*** To whom the correspondence should be addressed:** Tel: (33) 0561 335 952; Fax: (33) 0561 335 886; Email: odile.humbert@ibcg.biotoul.fr

ABSTRACT

Pontin/RUVBL1 and Reptin/RUVBL2 DNA-dependent ATPases are involved in numerous cellular processes, and essential components of chromatin remodeling complexes or transcription factor assemblies. However their precise functions *in vivo* are still controversial. Using a biochemical approach, we studied the role of the nucleosome core particle and histone N-terminal tail modifications on the assembly and enzymatic activities of Reptin/Pontin. We demonstrate that monomers of Reptin and Pontin form a stable complex with mononucleosomes, and that interaction depends on the N-terminal region of histone H3. The ATPase activity of Reptin/Pontin is modulated by acetylation and methylation of the H3 tail. *In vivo*, association of Reptin with the progesterone receptor gene promoter correlates with changes in H3 marks of the surrounding nucleosomes. Furthermore, the H3 tail regulates the oligomeric transition of Reptin/Pontin. Monomeric Reptin/Pontin co-immunoprecipitates a different subset of interacting proteins than hexamers. We propose that changes in the oligomeric status of Reptin/Pontin helicases may serve as a platform to bring specific cofactors in close proximity to gene promoters and to load regulatory factors to establish an active state of chromatin.

INTRODUCTION

DNA of eukaryotic genomes is packaged into arrays of nucleosomes which represent the basic structural unit of chromatin. For DNA transactions, there is a necessity to maintain the DNA template readily accessible. Organization of chromatin structure and loading of transcription machinery and transcription factors are regulated by numerous factors among which Reptin and Pontin play an important role.

Reptin and Pontin (also referred as TIP48/TIP49 TIP49B/TIP49A, RuvB12/RuvB11, Rvb2/Rvb1, TIH2/TIH1, TAP54 α /TAP54 α , ECP51/ECP54 (1)) were originally identified as components of transcriptional multi-subunit complexes (2). Later, they were shown to physically associate with several transcription factors (RNA polymerase II holoenzyme, c-Myc, β -catenin, E α , E2F1, ATF2...)(3). Depending on the context, they play antagonistic, repressive or activating roles, during transcriptional regulation of gene expression and embryonic development (3). Besides their interaction with transcription factors, Reptin and Pontin belong to three ATP-dependent chromatin remodeling complexes: TIP60 (4,5), INO80 (6-8), and SWR1 (9,10) that intervene both in transcriptional processes and in double strand break response. The Reptin and Pontin proteins appear not only as major sub-units of these large macromolecule networks, but also as necessary elements for their activity.

Reptin and Pontin are closely related and highly conserved eukaryotic proteins. Nevertheless they are both essential for viability in yeast (11), *Drosophila melanogaster* (12), and *Caenorhabditis elegans* (13). Both proteins are present in most of the cellular assemblies, but complexes containing one of the proteins without the other have also been characterized (14).

From a structural point of view, Reptin and Pontin bear the characteristic motifs responsible for ATP binding and hydrolysis of the AAA+ family (ATPases Associated with diverse cellular Activities): Walker A and B, arginine fingers and sensor domains. The minimal subunit consists in monomers that are divided into three domains (13). The N-terminal domain I contains the conserved Walker A and Walker B regions. The C-terminal domain III associates with domain I to form a nucleotide pocket in a three-dimensional structure. Between Walker A and Walker B motifs, there is an original insertion of 170 amino acids which corresponds to domain II. It is structurally organized as an OB-fold domain, and similar to the 3D-structure of the ssDNA-binding domain of the replication factor RPA (13,15). X-ray and electron microscopy (EM) studies of both human and Yeast proteins reported the architecture of Reptin – Pontin complexes as single hexameric rings (13,16,17), or more compounded assemblies described as dodecameric rings (18-21). An overall hexameric molecule comprises monomers connected through interactions of DI - DIII domains from adjacent subunits, encircling one ADP unit.

However there are only a few evidences for the physiological reality of every oligomeric structure, all referring to the multimeric structures, hexamers or dodecamers (18, 39, 45), but none to the monomeric structures.

Enzymatically, Reptin and Pontin share ATPase and helicase activities. Both activities are DNA-dependent. The isolated DII domain of Pontin has been shown to bind nucleic acids (ssDNA, dsDNA, RNA) *in vitro* (13). In addition, we have previously reported that the DNA binding capacity relies on the monomeric form of Reptin (22). The limiting step for binding is the initial cooperative loading of the protein onto DNA. This binding cooperativity would attest that a critical number of protein subunits is required in a closed vicinity on DNA. DNA binding stimulates a weak ATPase activity; it also supports a slow 3'-5' DNA unwinding activity (22). In contrast Reptin hexamers are inactive for ATP hydrolysis, and DNA unwinding (22). Similar results were observed for Pontin (unpublished data).

Biological activities of the Reptin and Pontin proteins are generally inferred from the function of factors they are associated with and which are mostly descriptive data (for reviews, (23-25). Mechanisms through which Reptin and Pontin exercise their activities are far from being understood. A role in the proper assembly of the multicomponent chromatin remodeling complexes, INO80 and Tip60, were proposed (4,7,23), but no link with the enzymatic activities of the Reptin/Pontin was yet established.

Here we define how the biochemical properties of the Reptin/Pontin proteins contribute to chromatin remodeling complexes or transcription factor assembly functions. We focused on the fact that biochemical functions of Reptin and Pontin are regulated at the level of their DNA binding properties. We demonstrate a physical interaction between monomers of Reptin/ Pontin proteins and the nucleosome. This physical interaction relied on H3-tail and correlated with a functional interaction. We identified an original mechanism showing how the Reptin/ Pontin enzymatic capacities are modulated by H3-tails post-translational modifications. Moreover, H3-tails regulated conformational transitions of the Reptin/Pontin proteins that may coordinate recruitment of different partners.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

Anti-Reptin antibody [2E9-5] (SAB4200115, Sigma), Anti-TIP49A (Pontin) antibody [2943C1a] (ab51500, Abcam), Anti-Histone H2A (ab13923, Abcam), Anti-Histone H3 antibody (ab1791, Abcam), ER α Antibody [H-184] (sc-7207, Santa cruz biotechnology), HDAC1 Antibody [10E2] (sc-81598, Santa cruz biotechnology), HDAC2 Antibody [3F3] (sc-81599, Santa cruz biotechnology), anti-MLH1 [clone 14] (ab-1, Oncogene Research Product), anti-PCNA [clone PC10] (ab-1, Calbiochem).

Protein purification

Pontin and Reptin purification: Recombinant *Homo sapiens* Reptin protein was produced in bacteria and purified as described (22) except with 100nM IPTG for induction. Recombinant *Rattus norvegicus* Pontin was produced following the same protocol but with 3 hours IPTG induction. Each protein was separately purified as monomer and as hexamer (Data not shown).

Histone purification: The coding sequences of *Homo sapiens* full-length histones H2A, H2AX, H2A.Z, H2B, H3 and H4 were a kind gift from Dr A. Hamiche (IGBMC, Strasbourg, France). The coding sequence of the tailless H3 was obtained by PCR amplification subcloning of the H3 coding sequence starting at the fortieth position (Histidine codon coding), to the end of sequence. To optimize the production of H2AX and H4 histones, the coding sequence of the first codons were changed. For H2AX histone the sequence ATG TCG GGC CGC GGC AAG turns into ATG TCT GGA CGT GGA AAG. This modification does not alter the protein sequence. For H4 histone, the sequence ATG TCT GGC CGC GGT AAG turns into ATG ATA GGC AGA GGT AAG. This modification leads to replace Serine by Isoleucine at second position of H4 protein sequence. Recombinant histone proteins were produced in bacteria and purified as described (26). We provided some changes to the original protocol. Briefly, H2A.Z, H2B and H3 histones were expressed in BL21 (DE3) *E. coli* strain and H2A, H2AX and H4 histones in Rosetta (DE3) pLysS *E. coli* strain. After expression, histones were recovered in inclusion bodies that were washed, solubilized, applied to a strong cation exchange column (HiTrapTM SP Sepharose FF, 1 ml, GE Healthcare) and eluted with the same step procedure than the original protocol. Purified histones were lyophilized and conserved at -80°C. Lyophilized histones were used to reconstitute H2A-H2B, H2AX-H2B

and H2A.Z-H2B dimers and the (H3-H4)₂ tetramer, purified on gel filtration column (HiLoad 16/60 Superdex S-200 PG column, GE Healthcare).

Mononucleosomes assembly

The positioning sequence used for nucleosome reconstitution is contained in a pUC18 plasmid (27). A 193-bp DNA fragment (used to assemble Nucl-193) was synthesized by PCR using 5'-biotinylated primers (see Figure S2A for schematic). A 148-bp DNA fragment (used to assemble Nucl-148) was obtained after blunt-ended enzymatic digestion (*ScaI-AluI*, on Figure S2A) of the 193-bp product. The DNA fragments were gel-purified, and end-labeled by T4 Polynucleotide kinase (Promega) using [γ -³²P]ATP. Nucleosome assembly by salt gradient dialysis was performed as described previously (28). The efficiency of nucleosome assembly was monitored by electrophoretic migration in a 6% polyacrylamide gel in 0.5X Tris-borate-EDTA, and Mononucleosomes were isolated from the gel as described (28).

Electrophoretic Mobility Shift assay (EMSA) and supershift assay

EMSA: 0.3 to 0.9 μ M of Reptin or Pontin were incubated 15 min at 4°C with 0.06 nM of ³²P end-labeled nucleosome-DNA substrate (DNA-equivalent) or 20-bp or 40-bp substrate, in 10 μ L reaction volume containing 25 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 2.5 mM Mg(CH₃COO)₂, 0.2 mM DTT, 100 μ g/ml BSA (Sigma) (RB 1X buffer) supplemented with 2 mM ATP or ADP as indicated. The reaction was loaded onto a 6% polyacrylamide gel in 0.5X Tris-Borate-EDTA.

Supershift assay: 2 μ M of Reptin or Pontin was incubated 15 min at 4°C with 0.06 nM of Nucl-193 in 10 μ L reaction volume containing RB 1X buffer supplemented with 1.5 μ g of Anti-Histone H2A.

Western blot on shift assay: 2 μ M of Reptin or Pontin was incubated 15 min at 4°C with 0.5 nM of end-labeled Nucl-193 in 40 μ L of RB 1X buffer. The reaction was loaded onto a 6% polyacrylamide gel in 0.5X Tris-borate-EDTA. After migration, gel was soaked in Tris-glycine SDS buffer, and proteins and DNA were electro-transferred on nitrocellulose membrane which was then probed by standard Western blot procedures using Anti-H3 antibody to detect H3 and ExtrAvidin[®]-Peroxidase (E2886, abcam) to reveal DNA.

DNA unwinding and ATPase assays

DNA unwinding and ATPase assays were previously reported (22). *DNA unwinding assays:* We used a DNA substrate corresponding to a hemiduplex of radiolabeled 21-mer oligonucleotide hybridized to the 5' extremity of a 115-mer ssDNA. Reaction was performed with 1 nM of substrate, 100 nM of Reptin in RB 1X buffer/1 mM ATP. ATPase assays: Reptin or Pontin protein (1 μ M) was pre-incubated, at 37°C, with 12.5 μ g/ml of ssDNA (M13mp18 single-stranded DNA, NEB Biolabs) before adding H3-tail peptides. The 'p21' synthetic peptide used as a control corresponds to residues 137-160 of human p21 protein (SGSGKRRQTSMTDFYHSKRRLIFS).

Far-Western blot, Dot Blot and Pull-Down assays

Far-Western Blot: 20 pmol of (H2A-H2B) dimer or 10 pmol of (H3-H4)₂ tetramer were separated on SDS-PAGE, and electro-transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C extra, Amersham Pharmacia Biotech). After blocking for 30 min in B Buffer (20 mM Hepes pH 7, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 0.1 % NP-40) supplemented with 1% of low fat milk, membrane was incubated 2 hours with 100 nM of Reptin or Pontin diluted in B Buffer. After two washes in B buffer, membrane was re-blocked in PBS with 3% of low fat milk. Then, detection of Reptin and Pontin was performed like standard Western Blot procedures

Far-Western Dot-Blot: 200 pmol of peptides corresponding to the N-terminal extremity of H2A and H3 histones were spotted onto nitrocellulose membrane using the vacuum system 10447850 Acrylic Minifold I Spot-Blot 96 Well Plate System (Whatman).

Pull-Down assays: Synthetic biotinylated peptides (10 μ M) carrying unmodified or modified H3-tail sequences were added to Reptin (1 μ M) in RB1X buffer for a 30 minutes incubation at 30°C. When needed, proteins have been pre-incubated with ssDNA (115 b oligonucleotide, 1 μ g/ml) and/or ATP (1 mM). The complexes were pulled-down with magnetic streptavidin-coated beads, washed three times with a solution containing 2.5 mM Tris-HCl (pH8), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ 10 % glycerol, 0.1 % NP-40, and 0.5 mM DTT, and resuspended in the loading buffer for SDS-PAGE. A Reptin-specific band was detected by Western blot analysis.

ChIP assays

MCF-7 cells were purchased from ATCC and were maintained in DMEM/F12 without phenol red with Glutamax containing 50 mg/ml gentamicin, 1 mM sodium pyruvate and 10% heat-inactivated and steroid free fetal calf serum (FCS) (Invitrogen). MCF-7 cells were treated with 10^{-7} M estrogen E2 (Sigma) for the indicated times. ChIP analyses were performed as described previously (29). Samples were sonicated to generate DNA fragments <500 bp. Chromatin fragments were immunoprecipitated using antibodies against H3k9-me2 (ab1220, Abcam), pan Acetyl H3 (ab47915, Abcam), H3 (ab1791, ABCAM), or an irrelevant HA antibody (H6908, Sigma). Anti-Reptin was synthesized by the laboratory from the purified protein (30). The precipitated DNA was amplified by real-time PCR, with primer sets designed to amplify the promoter (TSS) of the *PGR* gene (Figure 5A). qRT-PCR primers: *PGR* 5'-GCCTCGGGTTGTAGATTTC-3' and 5'-TCGGGGTAAGCCTTGTTGTA-3. All ChIP data are shown as percent input.

Co-immunoprecipitation analyses.

800 μ l (10 mg/ml) of HeLa Nuclear Extract (HNE) were pre-cleared for 4 hours at 4°C with 80 μ l of previously equilibrated ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (Sigma) in IP300 buffer (300 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT, 5 mM MgCl₂). Pre-cleared samples (100 μ l) were mixed with monomeric or hexameric form of Reptin or Pontin proteins (10 μ g) in 180 μ l reaction buffer containing 25 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 2.5 mM Mg(CH₃COO)₂, 0.2 mM DTT, 100 μ g/ml BSA (Sigma) for 1 hour at 4°C. Reptin or Pontin complexes were recovered by incubating the samples with 20 μ l of equilibrated anti-flag gel overnight at 4°C on a rotating wheel. Beads were washed four times in IP300 buffer, and Reptin and Pontin complexes were eluted with 100 μ l of flag peptides (250 μ g/ml) in IP300 buffer. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

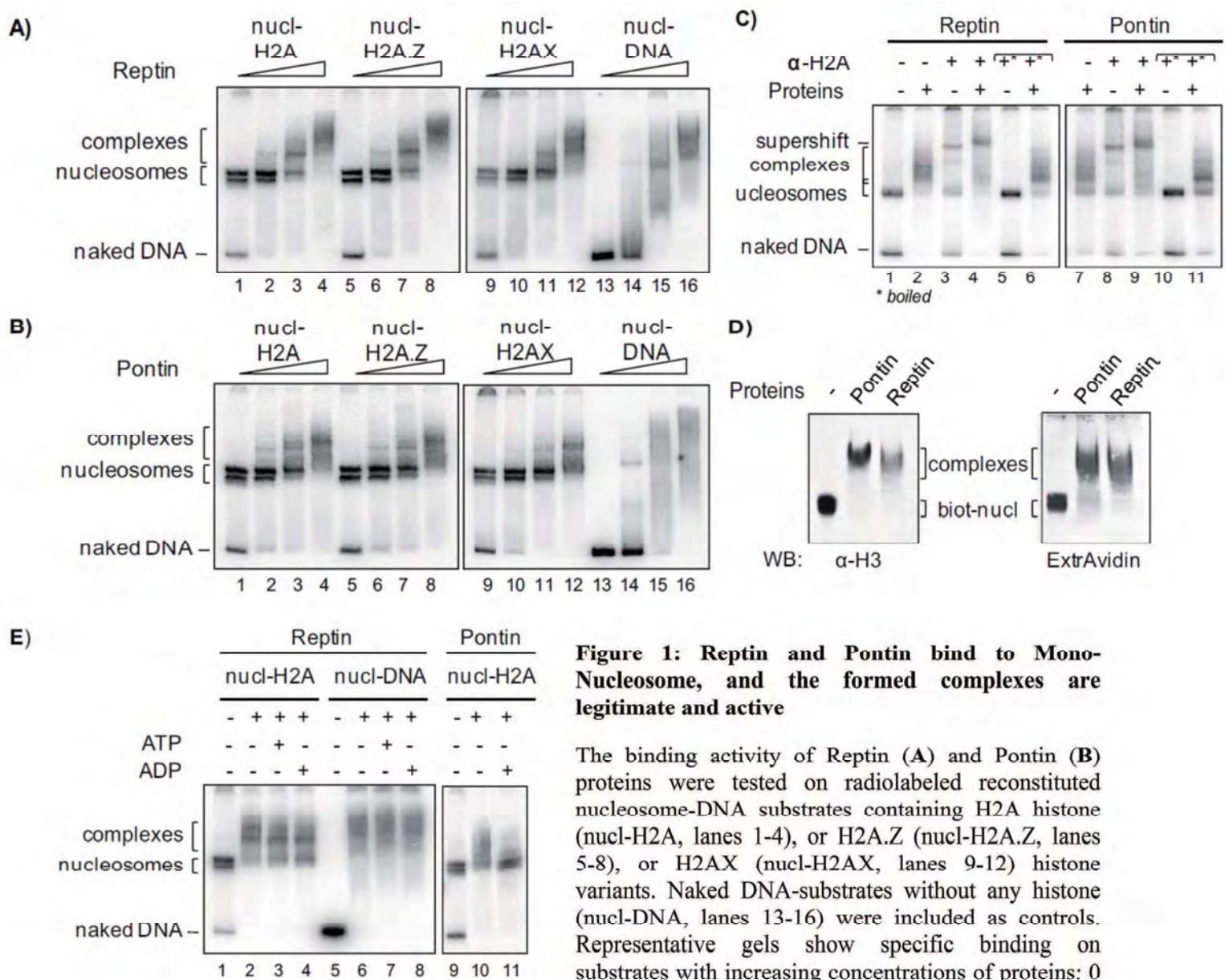


Figure 1: Reptin and Pontin bind to Mono-Nucleosome, and the formed complexes are legitimate and active

The binding activity of Reptin (A) and Pontin (B) proteins were tested on radiolabeled reconstituted nucleosome-DNA substrates containing H2A histone (nucl-H2A, lanes 1-4), or H2A.Z (nucl-H2A.Z, lanes 5-8), or H2AX (nucl-H2AX, lanes 9-12) histone variants. Naked DNA-substrates without any histone (nucl-DNA, lanes 13-16) were included as controls. Representative gels show specific binding on substrates with increasing concentrations of proteins: 0 μ M (lanes 1, 5, 9, 13), 0.3 μ M (lanes 2, 6, 10, 14), 0.6 μ M (lanes 3, 7, 11, 15) and 0.9 μ M (lanes 4, 8, 12, 16). On the left-hand side of the gels, the DNA species listed by name indicate the gel mobility position. C) Resident presence of the histone proteins within the complexes formed by the Pontin and Reptin proteins was verified through supershift assays. H2A-antibodies (1.5 μ g) were added (lanes 4 and 9) to pre-formed complexes of radiolabeled nucl-H2A nucleosome-DNA substrates (0.06 nM) and Pontin or Reptin protein (2 μ M) (lanes 2 and 7) as indicated. The effect of the H2A-antibodies themselves was tested for the binding to nucleosome-DNA substrates (lanes 3 and 8). As a control, the H2A-antibody was boiled prior to addition to the binding reaction (lanes 5, 6, 10 and 11). The supershifted bands, the bands corresponding to the complexes and the naked DNA, are indicated on the left-hand side of a representative gel. D) Proteins associated to the complexes were analysed by Western Blot with H3-antibodies. Following electrophoresis, the gel-shifted bands encompassing the complexes (represented in lanes 1, 2, and 7 of A.) were transferred on a nitrocellulose membrane for immunodetection of H3 histone. From the same gel, the nucleosome-DNAs, either free or protein-bound, were positioned by Extravidin immunodetection of the biotine molecule present at the 5' extremity of the DNA fragment in the mononucleosome. For this experiment, nucleosome-DNA substrate and proteins concentrations were 0.5 nM and 3 μ M, respectively. E) The functionality of the protein-DNA complexes was subjected to the effect of ATP and ADP cofactors. Reptin or Pontin (0.8 μ M) were incubated to a mononucleosomal substrate (nucl-H2A, lanes 1-4 and 9-11), and a 2 mM concentration of ATP or ADP was added. Same experiment was performed with naked DNA (nucl-DNA, lanes 5-8) as substrate.

RESULTS

Reptin and Pontin bind to nucleosome as an active complex

We first determined an interaction of Reptin/Pontin with nucleosome core particles. For this purpose, we reconstituted nucleosome core particles containing the canonical histones, (H2A-H2B) dimers and (H3-H4) tetramers, on a 193-bp DNA carrying a positioning sequence (27)(see Figure S2 for schematic). As Reptin/ Pontin preparations, we used purified monomeric fractions because we know that this form of the proteins is proficient for DNA binding rather than oligomeric assemblies (22). Electrophoretic mobility gel shift assays showed that Reptin or Pontin monomers form stable complexes with nucleosome-DNA substrates (Figures 1A-1B, lanes 1 to 4), in the same range of protein concentrations as they form complexes with naked DNA (Figures 1A-1B, lanes 13 to 16).

We also prepared mononucleosome DNA substrates including H2A variants because Reptin and Pontin have been associated with H2A.Z exchange (31) and phosphorylated H2AX removal (4). We observed that complex formation on these substrates was as efficient as on canonical H2A nucleosome-DNA substrates (Figure 1A-1B, lanes 5 to 12).

To validate that Reptin or Pontin binding preserved nucleosome integrity, we first confirmed the presence of H2A protein in the binding complex. Addition of corresponding antibody produced a supershift of the pre-formed Reptin/Pontin-nucleosome complexes (Figure 1C, lanes 4 and 9). Moreover, Western Blot analysis of the retardation mobility band confirmed the presence of H3 histone in the Reptin/Pontin–nucleosome complexes (Figure 1D).

We next validated the functionality of this complex. We knew that ATP/ADP destabilized Reptin or Pontin monomer binding on ssDNA fragments, whereas these nucleotide cofactors did not significantly affect the stability of the protein-dsDNA complexes (Supplementary Figure S1, and Figure 1E, lanes 7-8). We therefore tested the effect of cofactors on the interaction between Reptin or Pontin and a reconstituted mononucleosome. As shown in Figure 1E (lanes 3 and 4), addition of ATP or ADP released the proteins from the substrates, suggesting that the pre-formed Reptin-nucleosome interaction is dynamic. A similar result was obtained with the Pontin protein (Figure 1E, lane 11). ATP/ADP induction of conformational changes of Reptin/Pontin might correlate with changes in their binding properties.

Reptin and Pontin preferentially bind to nucleosomes with linker DNA

Since experiments were carried out with mononucleosomes reconstituted on DNA fragments long enough to produce naked nucleotidic extensions (nucl-193), we wondered whether the linker DNA would modulate Reptin/ Pontin binding to nucleosomes. We used short DNA fragments to reconstitute mononucleosomes with no linker DNA (nucl-148). Affinity of both monomeric proteins was greater for nucl-193 than for nucl-148, suggesting that additional DNA favors formation and/or stability of bound complexes (Figure 2A).

However it seemed unlikely that nucleosome association of Reptin/ Pontin only relied on the binding to extranucleosomal DNA. First, binding to nucl-148 that completely lacks linker DNA was still effective (more than 30% of bound fraction for both proteins, Figure 2A). Second, nucleosome positions on the 193 bp DNA were mapped using restriction enzymatic protection (see Supplementary Figure S2) and found to occupy the positioning sequence a) either in a central position leaving symmetric extranucleosomal entry/ and exit DNA of 15 to 35 bp length, b) or in a distal position, leaving single extranucleosomal entry/ or exit DNA of 46 bp length at the most. For comparison, we used binding substrates of naked dsDNA that were 20- and 40-bp in length (Figure 2B). Percentages of bound fraction indicated that the longest DNA (ds-40) is a poorer binding substrate (50% and 24 % for Pontin and Reptin binding, respectively) than nucl-193 (85 % and 78.5 % for Pontin and Reptin binding, respectively).

Finally, we confirmed the stability of the nucl-193 binding complexes by competition experiments. Proven efficient ds- or ss-DNA binding substrates (ds115 and ss115, (22)) were only able to prevent band shift of nucleosome-DNA substrates when added in at least 10-fold molar excess to the reaction (Figure 2C).

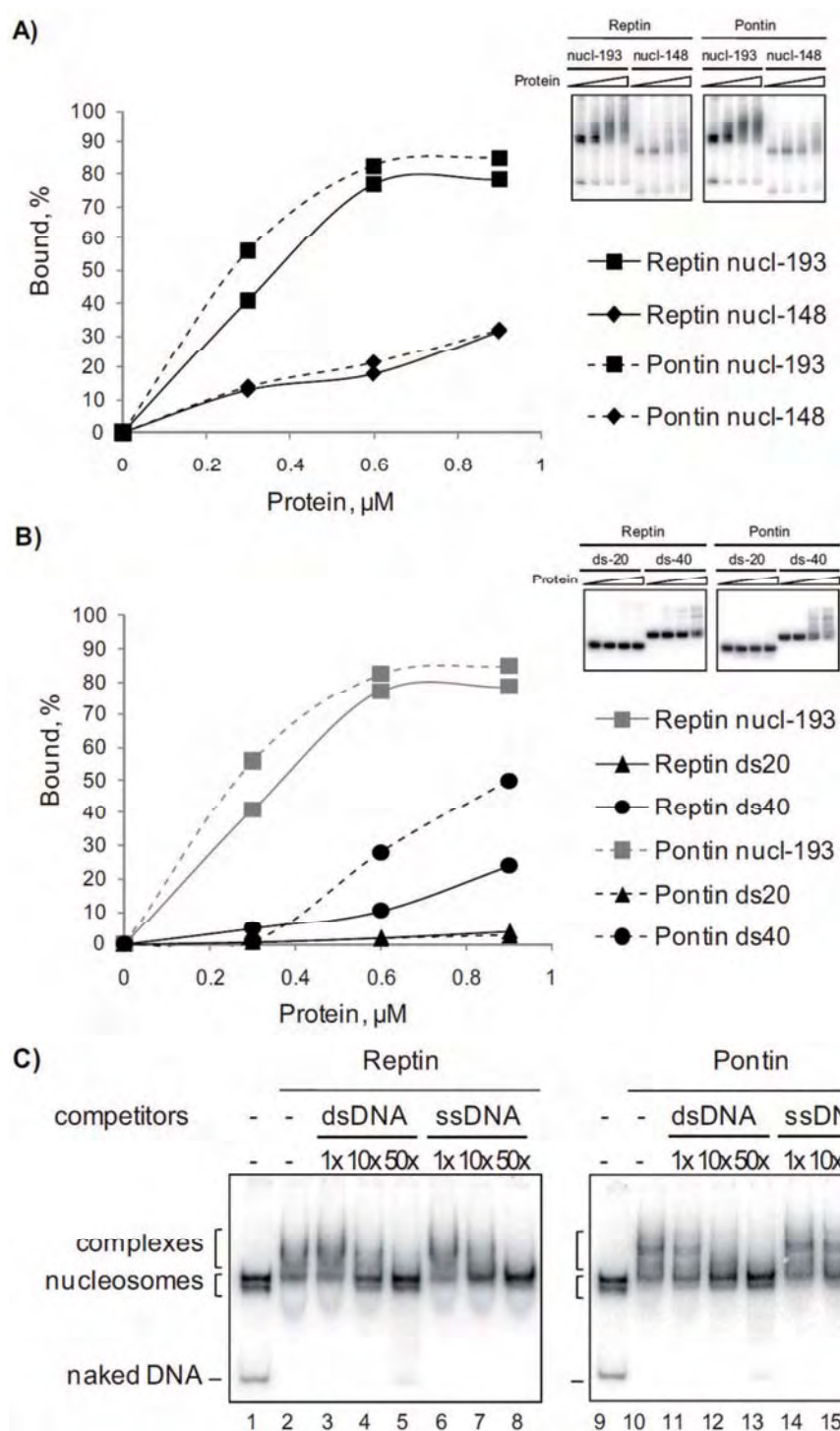


Figure 2: Reptin and Pontin preferentially bind nucleosomes carrying extranucleosomal DNA

A) Mononucleosomes were reconstituted with DNA fragments of 193 and 148 bp length (nucl-193 and nucl-148, respectively), both containing the positioning sequence. A schematic representation of nucleosome-DNA substrate is shown on the supplementary figure S2. The two kinds of nucleosome-DNAs served as substrates in EMSA experiments, using increasing concentrations of Reptin and Pontin proteins (0.3, 0.6, and 0.9 μM). PhosphorImager analysis of the gel gave the % of bound fraction as a ratio of the amount of radioactivity present in the retardation mobility bands of each lane relative to the total radioactivity of the sample, plotted as curves. **Inset:** Representative EMSA experiment used for quantifications. **B)** The binding capacities of Reptin and Pontin were evaluated on short naked double-stranded DNA substrates of 20 bp (ds-20) or 40 bp (ds-40) length, using the same range of protein concentrations as in A.

PhosphorImager analysis of the gel gave the % of bound fraction, as defined in A. Curves lined in grey color are from A. **Inset:** Representative EMSA experiment used for quantifications. **C)** The effect of ds- and ss-DNA competitors was tested for the binding on nucleosome-DNA substrates. Reactions of binding were carried out with 0.8 μM of proteins (Reptin, upper panel,

and Pontin, lower panel) in the presence of 1-, 10- or 50- fold molar excess of competitors, compared to the substrate. The competitors are DNAs of identical sequence and length (115 bp/ b) either in double-stranded or single-stranded form, as indicated. In A), B), and C), the bands are nominally identified on the left-hand side of a representative gel.

Interaction of Reptin/Pontin with the nucleosome core particle is controlled by post-translational modifications of the N-terminus of H3

In view of the nucleosome interaction, we next searched for a Reptin/Pontin interaction with histones themselves. It was reported that Poly(ADP-ribose) Polymerase I protein (PARP) binds linker DNA and interacts with histones (32,33). Indeed, Reptin and Pontin proteins specifically co-localized with H3 in Far Western experiments using purified recombinant H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramer (Figure 3A). As a control, repeating the same experiment but omitting to add the Reptin/ Pontin proteins, we could not detect any signal attesting that there was no artificial interaction of H3 with the secondary Western Blot antibody (data not shown).

The histone tail extensions are positioned outside of the nucleosome core particle, and thought to be largely unstructured and intrinsically flexible (34,35). Moreover, histone tails are preferential interacting partners and that makes them promising candidates for a Reptin/Pontin interaction. Pre-incubation of an excess of a synthetic peptide corresponding to the H3 N-terminal sequence with Reptin protein substantially weakened the interacting signal detected with the tetramer in a Far Western Blot (Figure 3B). In parallel, adding H2A-tail peptide produced no change in the interacting signal intensity. Finally, to confirm that H3 tail mediated Reptin/Pontin binding, we show that the interaction was completely abolished when H3 histone lacked its N-terminal extremity (Figure 3C).

Because the histone N-terminal domains are targets for numerous posttranslational modifications that occur during DNA metabolism, we wondered if covalent modifications could alter the Reptin/Pontin interaction. Among the modifications, we focused on methylation and acetylation of the H3-histone tail. We made use of synthetic peptides derived from the H3 tail sequence, either unmodified, or carrying di-Methylated group on Lysine 4 and 9, or Acetylated group on Lysine 14, 18 and 23 (Figure 3D). The expected interaction between H3 tail and Reptin/ Pontin was verified in Dot Blot experiments, and maintained with dimethylation marks (Figure 3E). We note, however, that signal intensity between H3 and methylated H3 peptides were slightly inversed for Reptin and Pontin. In contrast, acetylated marks interfered with the binding of the proteins, reducing the signal. At the same time, no binding to H2A-tail peptide was observed.

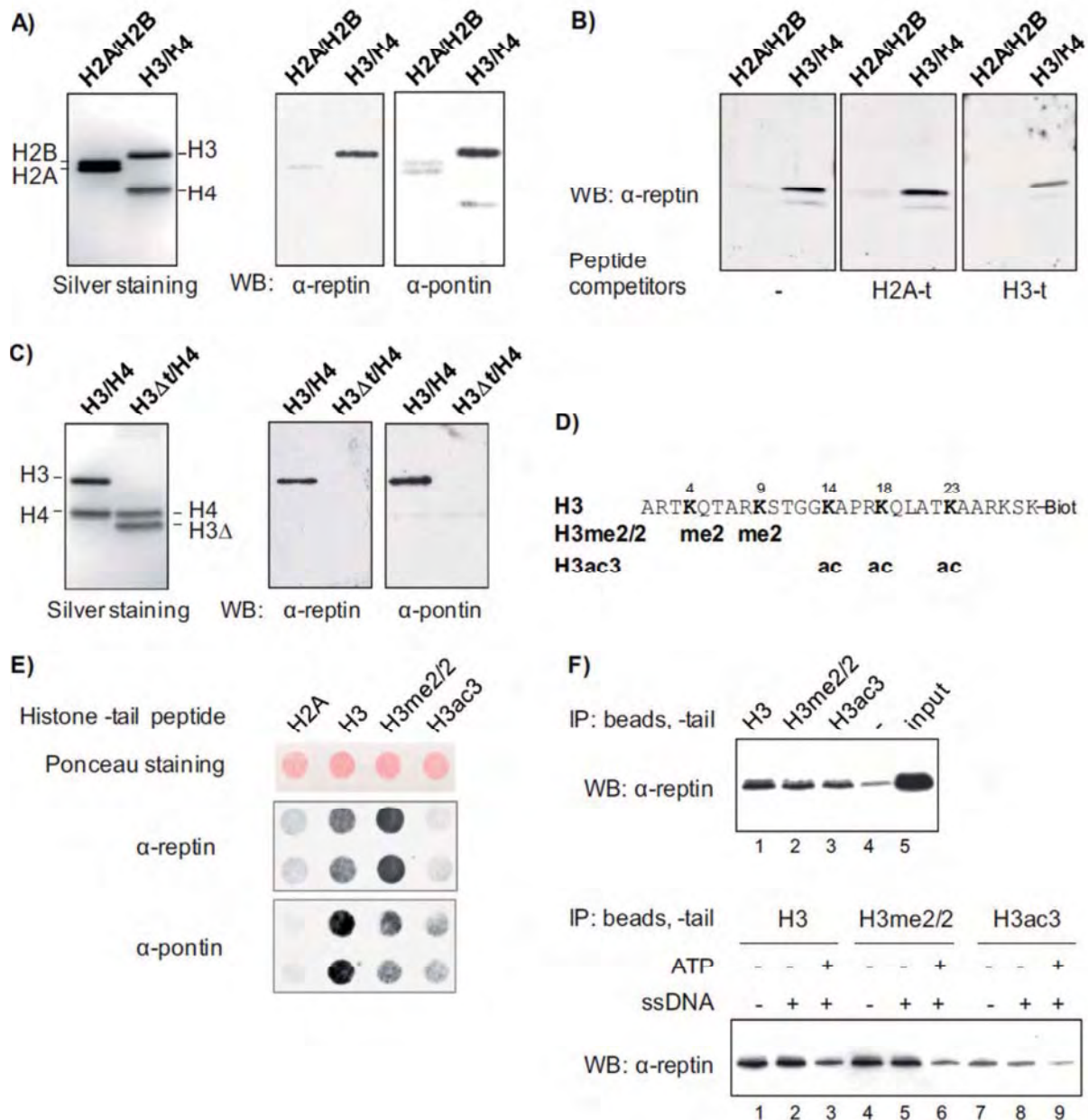


Figure 3: The Reptin and Pontin proteins physically interact with the histone H3 through the N-terminal tail

Refolded histones, as H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramers, were fractionated on a 16% SDS-PAGE. After electrotransfer to nitrocellulose, histones were subjected to Far-Western blotting analysis in the presence of Reptin or Pontin purified proteins. **A)** Resolved histones (20 pmol) were visualized on gel by silver staining. In parallel, nitrocellulose replicas were incubated with purified Reptin or Pontin proteins (250 pmoles), as indicated. The interacting signals were detected by Western blot using antibodies raised against Reptin and Pontin, respectively. **B)** The binding of Reptin to the H3 histone was challenged by an excess of peptide competitors (8 μ M), corresponding to the amino-terminal sequences of H2A or H3 histones. As a control, the left-hand side membrane was incubated in the absence of histone-tail peptides. The 3 membranes came from the transfer of a single Tris-Glycine 4-20% gel. **C)** Far Western experiments were carried out with H3 histone deleted for its tail-domain (H3 Δ t) or full-length H3 histone. On left panel, silver staining of the Tris-Glycine 18% gel accounts for the migration and the stoichiometric quantity of the considered histones from tetrameric assemblies (H3, H3 Δ t and H4, as indicated along both sides of the gel). On right panels, signals of the presence of Reptin and Pontin were detected by Western blot, and located only to the full-length H3 band, as referred to the staining gel.

Our attempts to demonstrate loss of interactions between Reptin/ Pontin and H3-tailless reconstituted nucleosomes were unsuccessful. Actually complex formation on these substrates was as efficient as on wild type nucleosome in EMSA experiments (Figure S3). A possible explanation could be that in the absence of the H3-tail, nucleosomal DNA was unmasked and served as a now better substrate for Reptin/ Pontin monomers binding.

The effect of H3 post-translational modifications on direct interactions were also seen in Pull-down experiments facilitated by the presence of a biotin group at the C-terminal extremity of the peptides for anchoring to streptavidin-coated beads. Using H3-derived peptides as bait and purified monomeric Reptin, we detected stable interactions between proteins and peptides (Figure 3F) again stronger with unmodified H3 and methylated H3 peptides compared to acetylated H3 peptides. These interactions were Reptin-specific since no significant signal was detected in the absence of peptides (Figure 3F, upper panel, lane 4). Presence of ssDNA did not change the efficiency of interaction (Figure 3F, lower panel, lanes 2, 5 and 8). But extra addition of ATP lowered the affinity of Reptin for the H3 peptides (lanes 3, 6 and 9). This observation could be explained by a conformational change of the Reptin monomer induced by the co-presence of ssDNA and ATP.

Legend of **Figure 3** continues here :

D) Peptide sequences correspond to the 1-29 amino acids of the H3 N-terminal tail. The positions of the di-methylated lysine residues (K4 and K9) in the H3me2/2 peptide, and the acetylated lysine residues (K14, K18 and K23) in the H3ac3 peptide, are shown as bold characters. All the peptides carry a biotin labeling at the C-terminal extremity. **E)** Peptides of unmodified (H3), methylated (H3me2/2), and acetylated (H3ac3) H3-tails probed with Reptin or Pontin proteins, were detected by immunoblotting with the corresponding antibodies in Dot Blot experiments. H2A-tail peptide (H2A) (sequence is given in "Material and Methods") was used as a contro. Loading is set up in duplicate with two repeats of the same peptides spotted on the first and second lane. A Ponceau staining of the membrane validate equal levels for each peptide. **F)** Interaction of Reptin protein with H3 histone tails was examined by pull-down assays using the biotinylated tail-peptides immobilized to magnetic streptavidin-beads. Beads pre-bound to unmodified (H3, lane 1), methylated (H3me2/2, lane 2) and acetylated H3 (H3ac3, lane 3) peptides were incubated with Reptin protein. At the end of the reaction, the presence of Reptin on the beads was verified by Western blot with specific antibody. On the top panel, the binding reaction was performed in the presence of 26 nM of ssDNA (115 bases oligonucleotide). Mocked beads (-) are shown for comparison (lane 4). Lane 5 contains 100% of the input Reptin. On the bottom panel, the binding reaction was performed in a combination of conditions, *i.e.* presence of ssDNA (ss115, 26 nM), and/or ATP (1 mM).

The physical interaction between H3-tail and Reptin/ Pontin is a functional interaction

To test whether the interaction of Reptin/ Pontin to nucleosomes was functionally important for their enzymatic activities, we assayed their helicase activity. Purified monomers of Reptin and Pontin possess a 3' to 5' DNA-unwinding activity that requires 3'-ssDNA extensions of ≥ 30 nucleotides ((22) and data not shown). Addition of N-terminal H3 sequence to the reaction completely inhibited the DNA unwinding capacity of Reptin (Figure 4A). The methylated H3 tail was even slightly inhibitory. However, the acetylated H3 tail did not influence helicase activity as if the acetylated groups added to the H3 tail were sufficient to suppress the inhibitory effect induced by unmodified H3-tails. Keeping in mind that helicase activity requires ATP hydrolysis (22), we then monitored the effect of histone tails on Reptin/ Pontin ATPase activity. Again the interacting peptides had a negative effect on ATPase activities. Indeed, addition of increasing amounts of H3 peptides to the ATPase reaction resulted in a decrease in Reptin/ Pontin ATP hydrolysis for unmodified and methylated H3-tails, but not for acetylated H3-tails (Figure 4B and 4C).

Nevertheless, these results could be ambiguous with regard to the biochemical properties of peptides themselves. Because they are long and positively charged, H3 peptides have a strong affinity for DNA. One could explain their inhibitory capacity by the fact that they would trap DNA from the Reptin/ Pontin enzymatic activities. We therefore included a control peptide, P21 peptide (sequence is given in "Materials and Methods" section), whose length and charge density were similar to the one of the unmodified H3-tail peptide. This control peptide did not inhibit the ATPase capacity of Reptin or Pontin (Figure 4B and 4C).

The presence of dimethylation on both H3-K4 and -K9 is not described in the literature. We therefore used two individual peptides with one type of methylation each to observe the effect of each H3-methylation on the Reptin/ Pontin ATPase activity. Still both of them disturbed the ATP hydrolysis capacity of Reptin and Pontin when added to the reaction (Figure 4B and 4C).

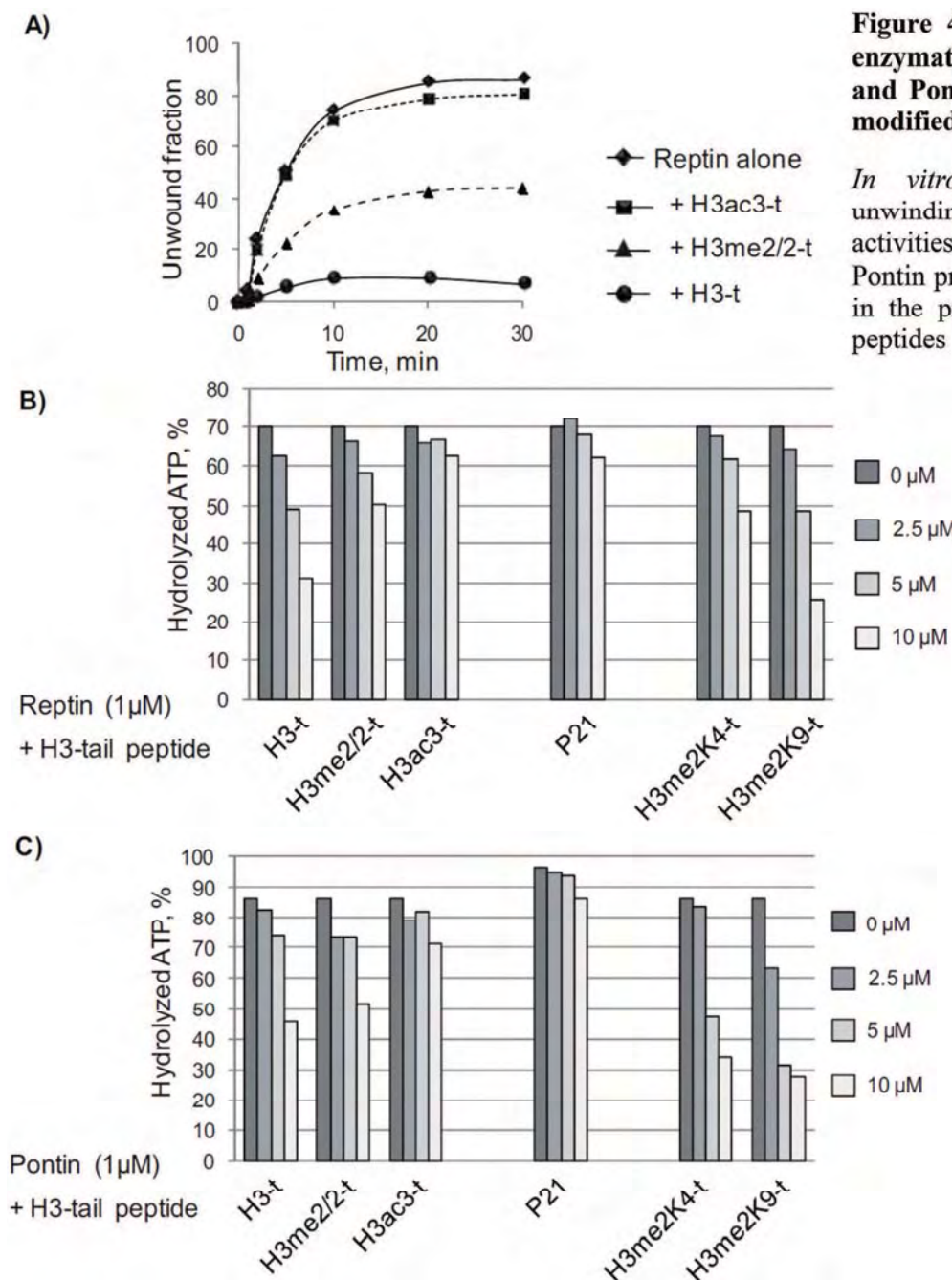


Figure 4: Modulation of the enzymatic activities of Reptin and Pontin by unmodified or modified H3-tail peptides

In vitro assays for DNA unwinding and ATPase activities of the Reptin and Pontin proteins were carried out in the presence of the H3-tail peptides described above (Figure 3D).

A) For DNA unwinding assay, 100 nM of protein was experimented with a 3'-5' substrate corresponding to a hemiduplex of a short radiolabelled oligonucleotide hybridized to the 5' extremity of a longer oligonucleotide. A 10-fold excess of trap oligonucleotide (complementary to the unwound radiolabelled probe) was added to the reaction mixture to prevent re-annealing. Samples were visualized on native TBE 8% polyacrylamide gels electrophoresis, and quantified on a Fuji BAS 3000

Phosphorimager as a ratio of the amount of radioactivity present in the released bands relative to the total radioactivity of the sample. Time course of 3'-5' helicase reactions with Reptin is shown as a representative graph where unwinding measurements were performed in addition of unmodified /or modified H3-tail peptides (1 μ M), as indicated. **B)** The steady-state ATPase activity of the Reptin protein was determined whereas proteins (1 μ M) were pre-incubated with ssDNA (12.5 μ g/ml of ssM13) before adding histone-tail peptides of unmodified H3 (H3-t), methylated H3 (H3me2/2-t) or acetylated H3 (H3ac3-t), or methylated H3 on K4 lysine residues (H3me2K4), and K9 lysine residues (H3me2K9), individually, in increasing concentrations (0, 2.5, 5 and 10 μ M). The effects of an irrelevant peptide (P21, sequence is given in Material and Methods) were also compared to those of the H3-t peptides. Results of the reactions are given as bar diagrams of ratios of produced ADP relative to total ATP (hydrolyzed ATP, %). **C)** Same conditions were applied for the Pontin ATPase activity.

***In vivo* dynamics of Reptin on the *Progesterone Receptor gene* promoter are associated with local changes in H3-tail covalent marks**

To evaluate the physiological relevance of the identified interaction between H3 tails and Reptin/ Pontin, we assayed the presence of the proteins on a promoter of an endogenous gene whose expression can be activated. We chose the estrogen receptor (ER)- α dependent promoter, the progesterone receptor promoter (*PgR*), in ER α positive human breast cancer cells (MCF-7). It was recently established that Reptin was required for initiating chromatin reorganization during 17 β -estradiol (E2) induction of the ER α target gene, *cyclin D1* (*CCND1*) oncogene (30). Pontin itself was not included in this study; nonetheless it usually belongs to Reptin complexes, and in particular, silencing one protein led to depletion of both proteins in MCF7 cells and other tumor cell lines (36). We found Reptin associated with the progesterone receptor (*PgR*) promoter in conditions under which *PgR* is not expressed (see MM and Fleury et al. 2008) using chromatin immunoprecipitation with an antibody directed against Reptin (Figure 5B). Addition of E2 to the cell culture for activation of the *PgR* transcription led to a 2.5-fold decrease in the amount of Reptin bound. We then explored the H3 content in the surrounding nucleosomes before and after E2 treatment. Using specific antibodies raised against acetylated lysines of the H3 N-terminal extension, we determined that acetylation levels at the *Pgr* promoter increased 2.2-fold following E2 induction (Figure 5C). Concomitantly, a 2.8-fold decrease in the H3K9 di-methylation levels was detected (Figure 5D), while the amount of total immunoprecipitated histone H3 remained unchanged (Figure 5E). Thus, variations in H3 post-translational modifications accompany Reptin binding to the *Pgr* promoter region independently of nucleosome occupancy.

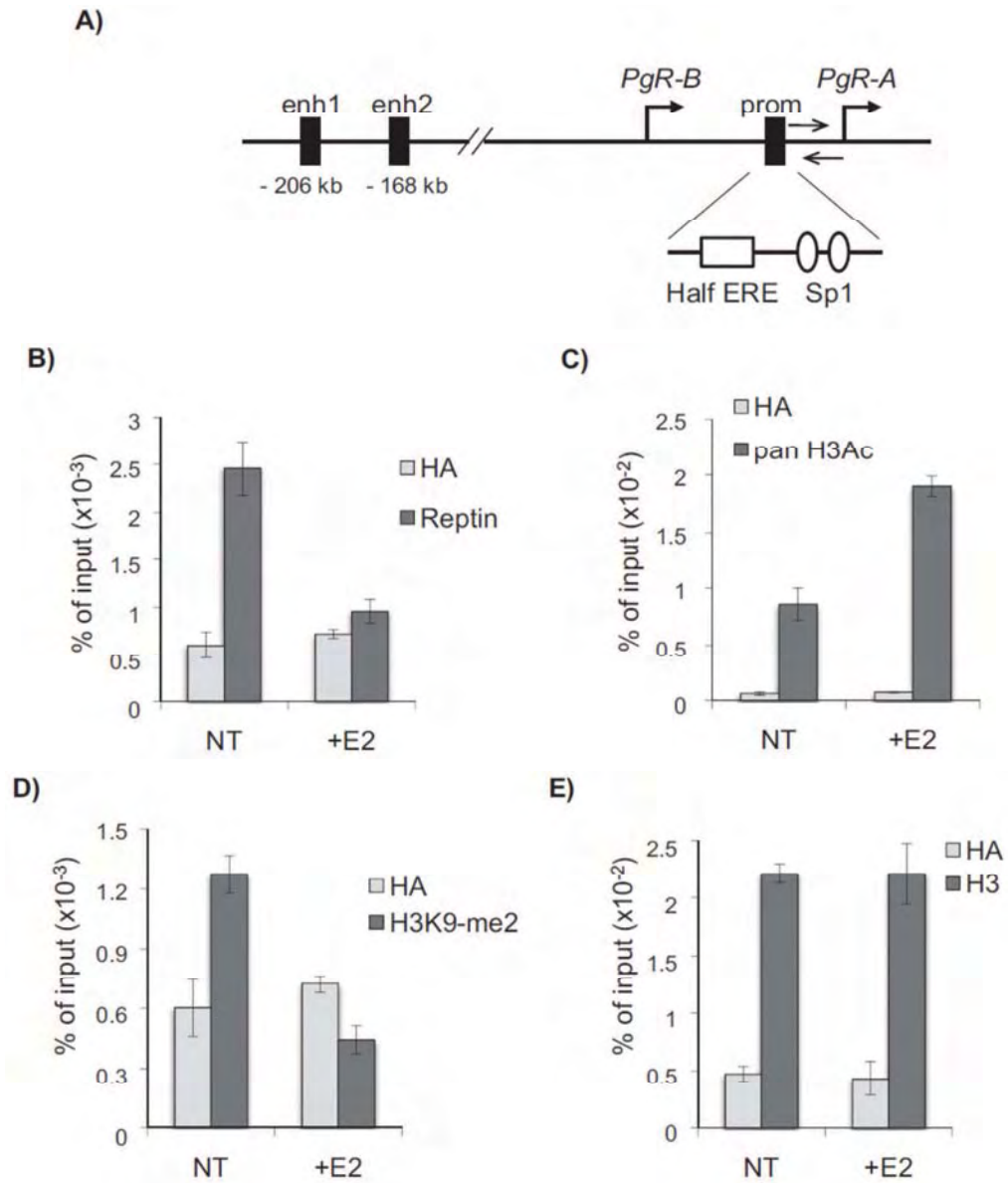


Figure 5: Reptin Dynamic on PGR promoter is associated with changes of acetylation/methylation state of adjacent H3 species

MCF-7 cells were cultivated 3 days in steroid stripped (white) medium and then induced by E2 10^{-7} M for 45 min. **A)** Schematic representation of *PGR* promoter. Black arrows indicate qPCR *PGR* primers. **B, C, D, E)** Kinetics of recruitment after an E2 induction of Reptin (**B**), pan Ac-H3 (**C**), H3K9-me2 (**D**) or histone H3 (**E**) to the *PGR* promoter using ChIP experiment and shown as percent input.

H3 tail modifications regulate monomer/hexamer transitions of Reptin/Pontin and control cofactor recruitment

Monomeric sub-units of Reptin and Pontin can assemble as hexameric rings or as dodecameric double rings (37). *In vitro*, ADP or ATP hydrolysis can promote their oligomerization (Figure 6A) (38). Our hypothesis was that H3 N-terminal extensions, and specific post-translational modifications, would control the structural assembly of Reptin/Pontin regulating their activity. In addition, each oligomeric state of Reptin/ Pontin proteins might be able to recruit a distinct set of cofactors that will control their function.

The conversion from purified monomers to hexamers and even dodecamers, clearly here induced by addition of ATP (Figure 6A, lane 2) or ADP (Figure 6A, lane 3), was monitored by native PAGE. Presence of DNA further stimulated oligomerization of Reptin (lanes 4-6). It was not possible to resolve Pontin migration on native gels as the protein has appeared unable to form detectable oligomers upon nucleotide binding (20,38). We thus evaluated the effect of H3-tail peptide modifications on Reptin oligomerization. At low ADP concentration (Figure 6B, lane 2), the presence of unmodified H3-peptide, or methylated H3-peptide, but not acetylated H3-peptide, facilitated the transition from monomers to hexamers (Figure 6B, lanes 3-5, and 6C). These results were confirmed by the quantification of each oligomer species present on several gels of distinct experiments. In the presence of either non-modified (Figure 6C, bar 3) or methylated (Figure 6C, bar 4) peptides, the percentage of hexamer was increased from $65.28\% \pm 4.30$ (bar 2) to $83.83\% \pm 3.24$ (bar 3, H3-t) or $85.86\% \pm 2.20$ (bar 4, H3me2/2-t). These dramatic and significant increases in hexameric formation were not observed when the peptide present in the reaction was acetylated (bar 5, H3ac3-t, $78.48\% \pm 0.7$).

We next evaluated the second part of our hypothesis that Reptin/Pontin coordinated recruitment of different proteins by changes in their oligomerization state. Co-immunoprecipitation experiments were performed from individually purified tagged-monomer or -hexamer forms of Reptin or Pontin, used as baits to complement HeLa nuclear extracts (Figure 6D). Obviously, we could not include H3-tail peptides because H3-tails are by themselves preferential sites of numerous protein interactions. We verified known interacting proteins of Reptin or Pontin (reviewed in (24)), but we also tested the presence of new potential partners. The profile of proteins which co-immunoprecipitated with Reptin or Pontin monomers was different from the one precipitating with the hexameric forms. The

ER α was found to interact with hexameric Pontin, while HDAC2, MLH1, PCNA bound to the monomeric form of reptin. HDAC1 in turn precipitated with both the monomeric and the hexameric Reptin fraction (HDAC1) (Figure 6D). We note that the exclusive presence of ER α in the Pontin hexamer complex was confirmed by a second antibody raised against the C-terminal part of the protein (data not shown). Co-immunoprecipitated Reptin and Pontin proteins were equally present in the monomeric and hexameric fractions associated with Pontin and Reptin baits.

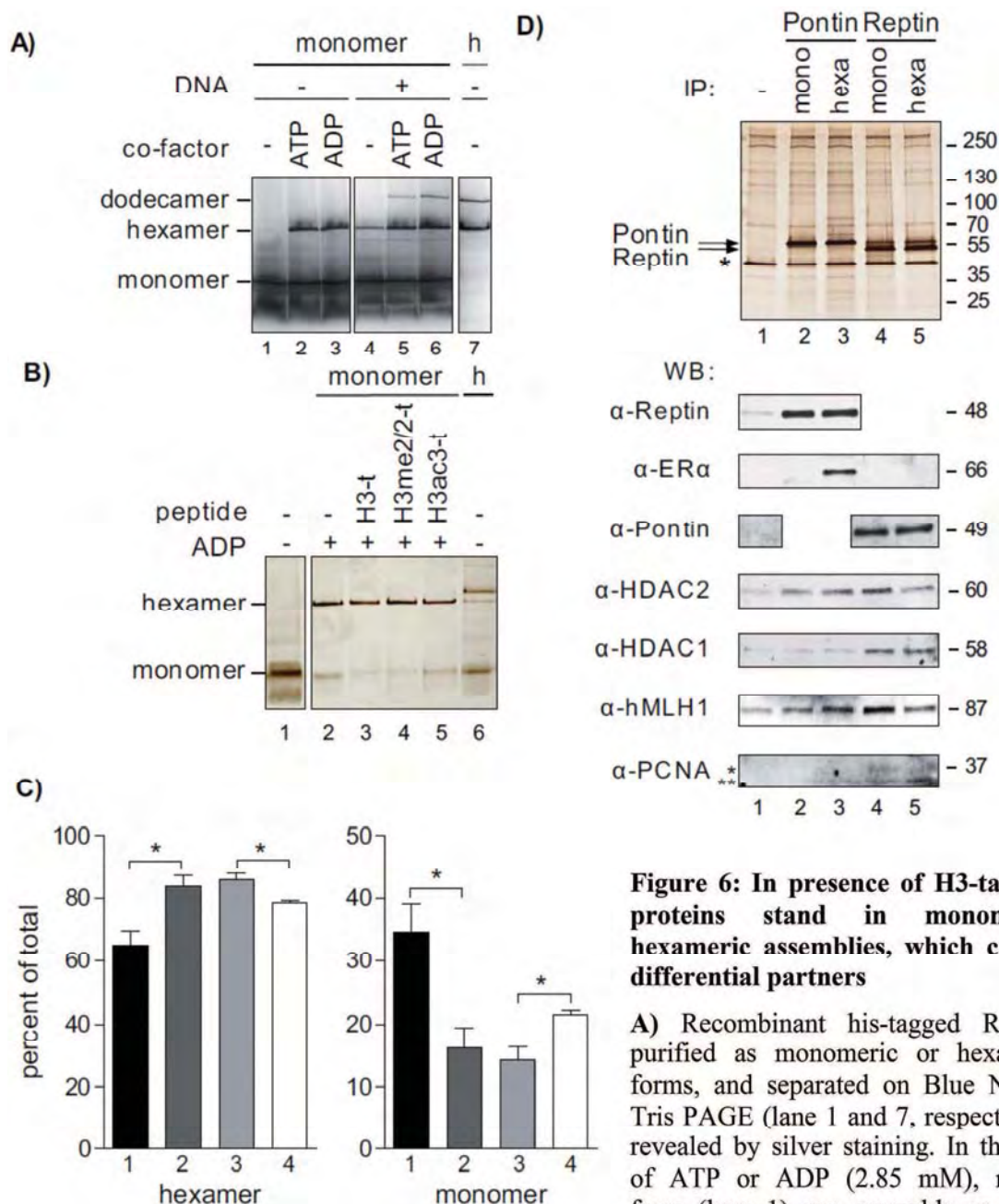


Figure 6: In presence of H3-tail peptide, proteins stand in monomeric or hexameric assemblies, which can recruit differential partners

A) Recombinant his-tagged Reptin was purified as monomeric or hexameric (h) forms, and separated on Blue Native Bis-Tris PAGE (lane 1 and 7, respectively), and revealed by silver staining. In the presence of ATP or ADP (2.85 mM), monomeric form (lane 1) can assemble as hexameric form (lane 2 and 3). If DNA (525 nM) is added simultaneously to the cofactors, dodecameric form happened (lane 5 and 6). The diverse oligomeric species are indicated on left-hand side of the gel. **B)** If ADP concentration is lowered (0.05 mM) (lane 2 and 3), monomeric (1 μ M) to hexameric transitions are made possible by the presence of H3-t peptides (8 μ M): unmodified H3-t (lane 3), methylated H3me2/2-t (lane 4) and acetylated H3ac3-t (lane 5). Positions of the monomeric and hexameric forms refer to the migration of the respective purified proteins (lanes 1 and 6), on a silver stained native gel. **C)** Images from four silver stained gels from individual experiments were scanned using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012) and the scans were further quantified (Plot Profile). Results are given as the percentage of total signal per gel lane for the hexameric (left) or monomeric (right) species. The bar numbers are related to the lane numbers of the gel shown on B). **D)** HeLa nuclear extracts were complemented with purified monomers (referred as mono, lanes 2 and 4) or hexamers (referred as hexa, lanes 3 and 5) of each Flag-tagged protein, as indicated. IPs were performed with either Pontin or Reptin, as bait. The co-immunoprecipitated proteins were detected by 4-20% SDS-PAGE followed by silver staining. Asterisk shows the position of precipitating IgG1 heavy chains. Lane 1 is a negative IP control, carried out in the absence of exogenous bait proteins, Pontin or Reptin. Presumed interacting proteins were identified by Western Blot analysis with specific antibodies raised against: ER, HDAC1, HDAC2, hMLH1, PCNA. Western Blot with anti-Reptin and anti-Pontin serve as positive controls for Pontin-IP and Reptin-IP, respectively. The double asterisk on the PCNA blot points out precipitating IgG1 light chains.

Discussion

The AAA+ family members, Reptin and Pontin, are essential components of several high-molecular weight protein complexes. While their structural features and contribution to the organization of these complexes are extensively studied, the function of Reptin/Pontin still remains unclear. In this study, we provide evidence for physical interaction and functional interplay between Reptin/Pontin and chromatin. We propose a model in which the Reptin/Pontin – nucleosome complex creates a platform for assembly of a variety of enzymatic complexes in a multistep process (see model Figure 7). Reptin/Pontin monomers are first recruited to DNA in nucleosome-free regions. At the vicinity of nucleosome, protruding histone H3 tails contact and stabilize this DNA-protein complex. H3 post-translational modifications modulate the physical interaction with Reptin/ Pontin, lost by H3-tail acetylation, but maintained by methylation. The interaction with the nucleosome seems to influence the oligomeric status of Reptin/ Pontin i) either indirectly by regulating enzymatic activities ii) or directly by modulating sub-unit assembly. Depending on their structural organization, Reptin and Pontin would promote association with different subsets of factors. This would constitute a control mechanism for partners' recruitment.

The main finding is that Reptin and Pontin are able to bind to nucleosomes. We and others previously demonstrated that monomeric subunits of Reptin and Pontin are able to bind to naked DNA (13,22). DNA binding conditions their biochemical ATPase and helicase activities (22). Here we show that Reptin and Pontin are also able to form complexes with nucleosomes. For the first time, we identify a physical interaction of Reptin/Pontin with histones, here the H3 tail. The relevance of this interaction is consistent with the presence of the proteins in remodelers and transcription factor networks. Moreover, using an integrative approach of electron microscopy, crosslinking and mass spectrometry, Tosi et al. (2013) have reconstituted the position of Reptin/Pontin within the chromatin remodeling complex INO80 and mapped interactions to the nucleosome (39). Among them, Reptin/ Pontin crosslinked to the N-terminus of H3. The study also mentions crosslinks of Reptin to H2B and H4, but these would require partial unwrapping of the DNA. Along with H3 interactions, we could not detect complexes with H2B or H4 histones probably because of a lack of sufficient stability. In addition, the H3 N-termini protrude from the both sides of the nucleosomal dyad axis, and are positioned on DNA at the entry-exit site of the nucleosome (40) at the exact place where a protein bound to free/linker DNA, like Reptin/Pontin, would meet the nucleosome.

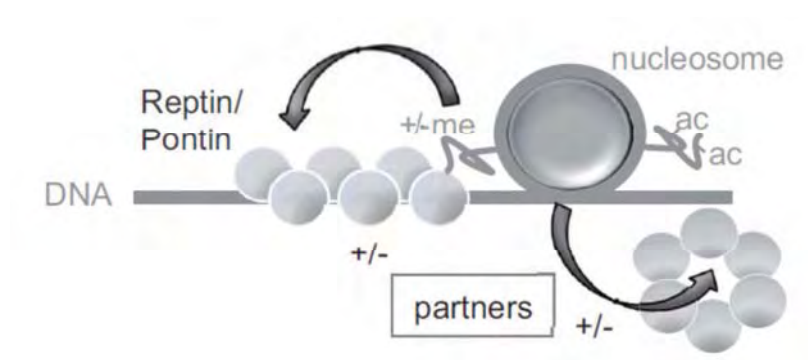


Figure 7: Model for reciprocal interplay between Reptin/Pontin proteins and chromatin

See text for details

Histone tails serve as binding sites for protein domains and target sites for post-translational modifications to regulate chromatin structure. Interaction of Reptin/ Pontin with H3-tails would mask and shield some of these preferential sites, hence controlling H3-tail accessibility. For this point, we can mention the direct interaction of Tip60 with H3 trimethylated K9 that activates the acetyltransferase activity of Tip60 (41). On the other hand, the H3-tail, depending on its post-translational modifications, would regulate comings and goings of Reptin/Pontin onto DNA, by interfering with the oligomeric structuring of the proteins. Relocation of Reptin has been observed on inducible promoters (this study; (30); and Papin C. personal communication). In the uninduced, repressed state, Reptin is associated with promoter sequences. Its presence possibly masks cognate response elements from specific factors like transcription factors, blocking gene activation. Upon induction, Reptin dissociates from DNA, possibly by hexamerisation, a conformation which is highly inefficient for binding naked DNA ((22) Supplementary Figure S4A).

Our model proposes that a change in Reptin/ Pontin oligomeric status would expose or mask distinct putative regions for interaction with partners. Indeed we observed disparities in the subset of proteins co-immunoprecipitated by monomers and hexamers of Reptin or Pontin (Figure 6D). For instance, ER was exclusively found in the immunoprecipitate of the hexameric fraction of Pontin, confirming our finding that Pontin has to dissociate from a promoter to allow ER recruitment and transcription activation. Several immunoprecipitated proteins were specifically associated with the Reptin monomer but not with the hexamer. PCNA, hMLH1, HDAC1 and HDAC2 were previously identified as Reptin partners (for review, (24)), but the interaction-proficient conformations were not defined. Additional experiments have also shown that the set of immunoprecipitated molecules varied when the monomer proteins were pre-incubated with ATP and/or DNA (O. Humbert, personal communication). For instance, these so-induced structures were less efficient to trap PCNA than monomer structures (Figure S5). And in reverse experiments, PCNA used as bait co-immunoprecipitated less protein when Reptin was ATP/DNA pre-incubated. At this point, it is noteworthy that the monomer is a critical player in the recruiting platform function of Reptin/ Pontin whereas its physiological relevance remains controversial. Some partner interaction sites have already been mapped on the Reptin or Pontin proteins. Several lie on DII domain of Reptin (c-Myc, Hint1, Ino80)(39,42,43), and would eventually become inaccessible within described compact double-ring structures (19). The strategy of conformation-dependent

interaction reported in our results might then explain the dynamic flux of proteins displaying affinity for Reptin or Pontin proposed in the literature (for review, (24)).

If purified hexamers of Reptin/Pontin are not efficient for naked DNA binding, they however form complexes with nucleosome-DNA substrates (Figure S4B). Thus a structural shift from monomer to hexamer might be accompanied by shifting the interaction from linker DNA to the adjoining nucleosome. The ATPase domain of Reptin/Pontin could regulate the spatial organization, from monomers lying on extranucleosomal DNA to hexameric /or dodecameric rings spanning the proximal nucleosome. In that case, both topology of linker DNA and histone marks would direct Reptin/Pontin to -1 or +1 nucleosome, in the same way they would induce the formation of a ring structure. Consequently, targeting on -1 or +1 nucleosome would expose surface from either Reptin or Pontin. Such scenario could explain why Reptin and Pontin were found to play an antagonistic role on the same promoter, due to interaction with different transcription factors (3). The idea of a predominant role of nucleosome-free region to target components on the proper nucleosome was recently evoked for SWR-C (44).

Our model fits perfectly the recently published structure and organization mechanism of INO80 and SWR1 remodeling complexes (39,45). These two remodeler complexes are implicated in incorporation/removal of H2A.Z (10,46). They depicted Reptin/Pontin as hetero-assemblies of hexa- or dodeca-units (39,45). The INO80 complex structures as a cradle, Reptin-Pontin rings would form the head which, along with the foot, sandwiches the nucleosome (39,45). The SWR1 corresponds to a four modules assembly to which Reptin/Pontin associate as hetero-hexameric ring and form, with Swr1, a depression that accommodates the nucleosome (39,45). Reptin/Pontin by a play of protein interactions might select the occupancy by one or the other remodeling complex. In that view, there would be no need for a direct interaction of Reptin/Pontin with the H2A.Z histone. Indeed in our search for Reptin/Pontin and nucleosome interactions, we could not detect any direct link with this H2A variant.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr Didier Trouche for providing the histone tail peptides. We are grateful to Dr Adilia Timmers for technical assistance and useful discussions during the course of this work, and to Dr Violette Morales for technical assistance in the histone purifications.

FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). R.Q. was recipient of PhD fellowships from the French Ministry for Research.

REFERENCES

1. Rosenbaum, J., Baek, S.H., Dutta, A., Houry, W.A., Huber, O., Hupp, T.R. and Matias, P.M. (2013) The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. *Sci Signal*, **6**, mr1.
2. Kanemaki, M., Makino, Y., Yoshida, T., Kishimoto, T., Koga, A., Yamamoto, K., Yamamoto, M., Moncollin, V., Egly, J.M., Muramatsu, M. *et al.* (1997) Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**, 64-68.
3. Gallant, P. (2007) Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol*, **17**, 187-192.
4. Jha, S., Shibata, E. and Dutta, A. (2008) Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol Cell Biol*, **28**, 2690-2700.
5. Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J. and Nakatani, Y. (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, **102**, 463-473.
6. Jin, J., Cai, Y., Yao, T., Gottschalk, A.J., Florens, L., Swanson, S.K., Gutierrez, J.L., Coleman, M.K., Workman, J.L., Mushegian, A. *et al.* (2005) A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J Biol Chem*, **280**, 41207-41212.
7. Jonsson, Z.O., Jha, S., Wohlschlegel, J.A. and Dutta, A. (2004) Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell*, **16**, 465-477.
8. Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, **406**, 541-544.
9. Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D. and Wu, C. (2005) Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1064-1071.
10. Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S. and Wu, C. (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, **303**, 343-348.
11. Qiu, X.B., Lin, Y.L., Thome, K.C., Pian, P., Schlegel, B.P., Weremowicz, S., Parvin, J.D. and Dutta, A. (1998) An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J Biol Chem*, **273**, 27786-27793.
12. Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R. and Pradel, J. (2000) Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *Embo J*, **19**, 6121-6130.
13. Matias, P.M., Gorynia, S., Donner, P. and Carrondo, M.A. (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem*, **281**, 38918-38929.
14. Diop, S.B., Bertaux, K., Vasanthi, D., Sarkeshik, A., Goirand, B., Aragnol, D., Tolwinski, N.S., Cole, M.D., Pradel, J., Yates, J.R., 3rd *et al.* (2008) Reptin and Pontin function antagonistically with PcG and TrxG complexes to mediate Hox gene control. *EMBO Rep*, **9**, 260-266.
15. Bochkarev, A., Pfuetzner, R.A., Edwards, A.M. and Frappier, L. (1997) Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature*, **385**, 176-181.

16. Petukhov, M., Dagkessamanskaja, A., Bommer, M., Barrett, T., Tsaneva, I., Yakimov, A., Queval, R., Shvetsov, A., Khodorkovskiy, M., Kas, E. *et al.* (2012) Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases. *Structure*, **20**, 1321-1331.
17. Gribun, A., Cheung, K.L., Huen, J., Ortega, J. and Houry, W.A. (2008) Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J Mol Biol*, **376**, 1320-1333.
18. Cheung, K.L., Huen, J., Kakihara, Y., Houry, W.A. and Ortega, J. (2010) Alternative oligomeric states of the yeast Rvb1/Rvb2 complex induced by histidine tags. *J Mol Biol*, **404**, 478-492.
19. Lopez-Perrote, A., Munoz-Hernandez, H., Gil, D. and Llorca, O. (2012) Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res*, 1-14.
20. Puri, T., Wendler, P., Sigala, B., Saibil, H. and Tsaneva, I.R. (2007) Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J Mol Biol*, **366**, 179-192.
21. Torreira, E., Jha, S., Lopez-Blanco, J.R., Arias-Palomo, E., Chacon, P., Canas, C., Ayora, S., Dutta, A. and Llorca, O. (2008) Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. *Structure*, **16**, 1511-1520.
22. Papin, C., Humbert, O., Kalashnikova, A., Eckert, K., Morera, S., Kas, E. and Grigoriev, M. (2010) 3'- to 5' DNA unwinding by TIP49b proteins. *FEBS*, **277**, 2705-2714.
23. Jha, S., Gupta, A., Dar, A. and Dutta, A. (2013) RVBs are required for assembling a functional TIP60 complex. *Mol Cell Biol*, **33**, 1164-1174.
24. Grigoletto, A., Lestienne, P. and Rosenbaum, J. (2011) The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1815**, 147-157.
25. Huen, J., Kakihara, Y., Ugwu, F., Cheung, K.L., Ortega, J. and Houry, W.A. (2010) Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem Cell Biol*, **88**, 29-40.
26. Luger, K., Rechsteiner, T.J. and Richmond, T.J. (1999) Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods Enzymol*, **304**, 3-19.
27. Grigoriev, M. and Hsieh, P. (1997) A histone octamer blocks branch migration of a Holliday junction. *Mol Cell Biol*, **17**, 7139-7150.
28. Hamiche, A. and Xiao, H. (2004) Methods for analysis of nucleosome sliding by *Drosophila* NURF. *Methods Enzymol*, **377**, 353-363.
29. Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D. and Legube, G. High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J*, **29**, 1446-1457.
30. Dalvai, M., Fleury, L., Bellucci, L., Kocanova, S. and Bystricky, K. (2013) TIP48/Reptin and H2A.Z requirement for initiating chromatin remodeling in estrogen-activated transcription. *PLoS Genet*, **9**, e1003387.
31. Choi, J., Heo, K. and An, W. (2009) Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A. *Nucleic Acids Res*, **37**, 5993-6007.
32. Pinnola, A., Naumova, N., Shah, M. and Tulin, A.V. (2007) Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. *J Biol Chem*, **282**, 32511-32519.
33. Clark, N.J., Kramer, M., Muthurajan, U.M. and Luger, K. (2012) Alternative Modes of Binding of Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 to Free DNA and Nucleosomes. *J Biol Chem*, **287**, 32430-32439.

34. Zheng, C. and Hayes, J.J. (2003) Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers*, **68**, 539-546.
35. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
36. Haurie, V., Menard, L., Nicou, A., Touriol, C., Metzler, P., Fernandez, J., Taras, D., Lestienne, P., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. *et al.* (2009) Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology*, **50**, 1871-1883.
37. Cheung, K.L., Huen, J., Houry, W.A. and Ortega, J. (2010) Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. *Biochem Cell Biol*, **88**, 77-88.
38. Niewiarowski, A., Bradley, A.S., Gor, J., McKay, A.R., Perkins, S.J. and Tsaneva, I.R. (2010) Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *Biochem J*, **429**, 113-125.
39. Tosi, A., Haas, C., Herzog, F., Gilmozzi, A., Berninghausen, O., Ungewickell, C., Gerhold, C.B., Lakomek, K., Aebersold, R., Beckmann, R. *et al.* (2013) Structure and Subunit Topology of the INO80 Chromatin Remodeler and Its Nucleosome Complex. *Cell*, **154**, 1207-1219.
40. Ettig, R., Kepper, N., Stehr, R., Wedemann, G. and Rippe, K. Dissecting DNA-histone interactions in the nucleosome by molecular dynamics simulations of DNA unwrapping. *Biophys J*, **101**, 1999-2008.
41. Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R. and Price, B.D. (2009) Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol*, **11**, 1376-1382.
42. Weiske, J. and Huber, O. (2005) The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci*, **118**, 3117-3129.
43. Wood, M.A., McMahon, S.B. and Cole, M.D. (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell*, **5**, 321-330.
44. Yen, K., Vinayachandran, V. and Pugh, B.F. (2013) SWR-C and INO80 Chromatin Remodelers Recognize Nucleosome-free Regions Near +1 Nucleosomes. *Cell*, **154**, 1246-1256.
45. Nguyen, V.Q., Ranjan, A., Stengel, F., Wei, D., Aebersold, R., Wu, C. and Leschziner, A.E. (2013) Molecular Architecture of the ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complex SWR1. *Cell*, **154**, 1220-1231.
46. Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J. and Peterson, C.L. (2011) Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell*, **144**, 200-213.

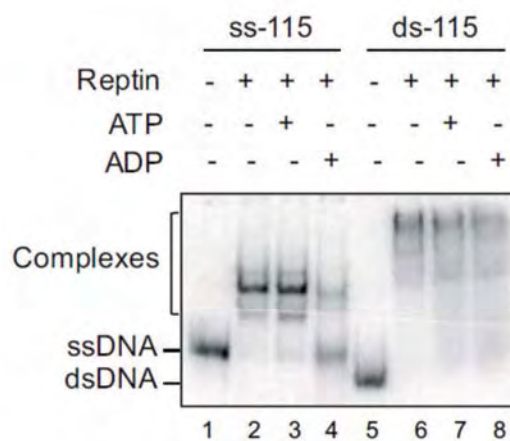


Figure S1: Nucleotide cofactor effects on binding complexes formed on ss- or ds substrates

Binding complexes were pre-formed on 115-mer oligonucleotides, with Reptin protein at concentration of 0.4 μM for ss-DNA and 0.8 μM for ds-DNA. Following 10 min incubation, cofactors were added for further 15 min incubation. Free DNA and binding complexes were designated on the left of the gel. It is to note that ds-115 migrated faster than ss-115, specifically on these 6% TBE acrylamide gels.

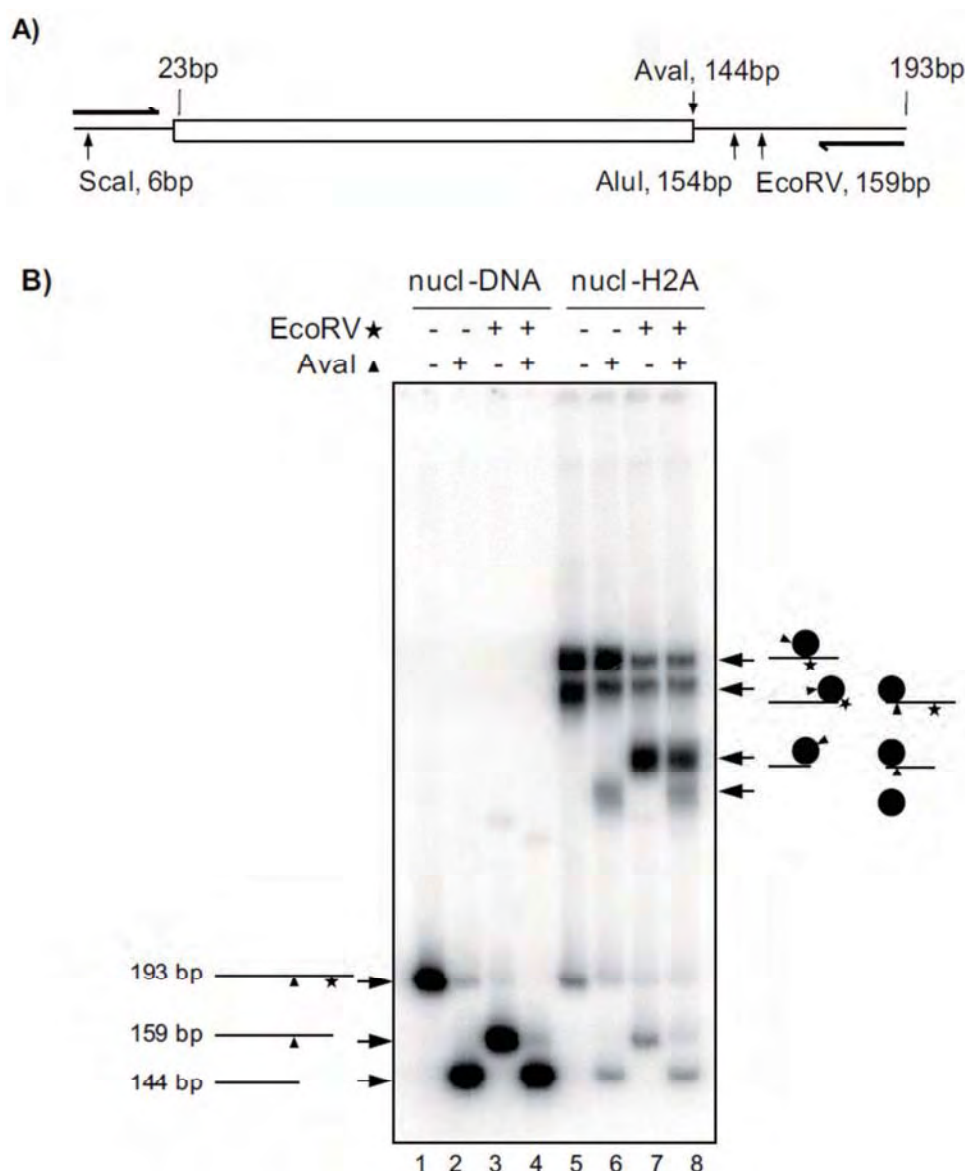


Figure S2: Characterization of nucleosomes

A) Schematic representation of the 193 bp DNA template used for nucleosome reconstitutions. DNA is illustrated as a line, where a rectangle stands for the preferential positioning sequence. Positions of the forward and reverse primers for amplification of the sequence are fixed at each extremity of the DNA. Locations of *AvaI* and *EcoRV* restriction sites (used for cartography see Figure S1-B), and *ScaI* and *AluI* (used to produce a 148 bp fragment) are indicated by arrows. **B)** Mononucleosomes reconstituted with end-labeled 193 bp DNA can adopt two alternative positions: centrally or end-positioned nucleosome. The extranucleosomal DNAs at one entry/exit of the nucleosome were identified by restriction digestion with either *AvaI* or *EcoRV*, or both, as indicated. Samples (6 ng) were analyzed by 6% native gel electrophoresis in 0.5X Tris-Glycine. Lanes 1 to 4 correspond to the digestive pattern of the naked 193 bp DNA (nucl-DNA), whereas lanes 5 to 8 are for the nucleosomal DNA substrate (nucl-H2A). Schematics of DNA species (lines used for DNA, black circles for nucleosomal particles) indicate gel mobility positions on both sides of the gel. Relative to the dyad axis, central nucleosomes carry extranucleosomal DNA of 15 to 35 bp, distal nucleosomes carry extranucleosomal DNA of at the most 46 bp.

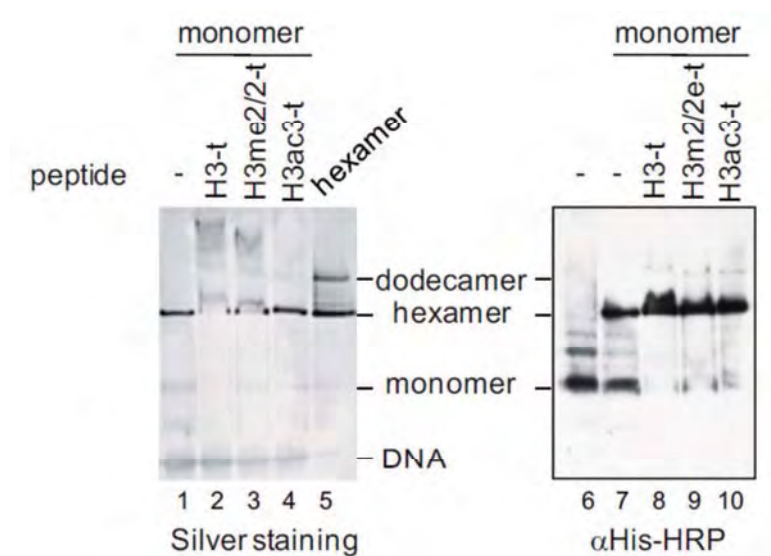


Figure S3: Hexamer formation from monomer

Hexamerisation of the monomeric particles was completed in the presence of ADP (2.85 mM), ssDNA (525 nM), and, when indicated, H3-tail peptides (unmodified H3-t, lane 2 and 8; methylated H3me2/2-t, lane 3 and 9; acetylated H3ac3-t, lane 4 and 10). The left panel shows the silver staining of native gel. The right panel corresponds to the detection of the proteins through the His-Tag by western blot with HRP coupled anti-His. The individual species are designated in between the two panels.

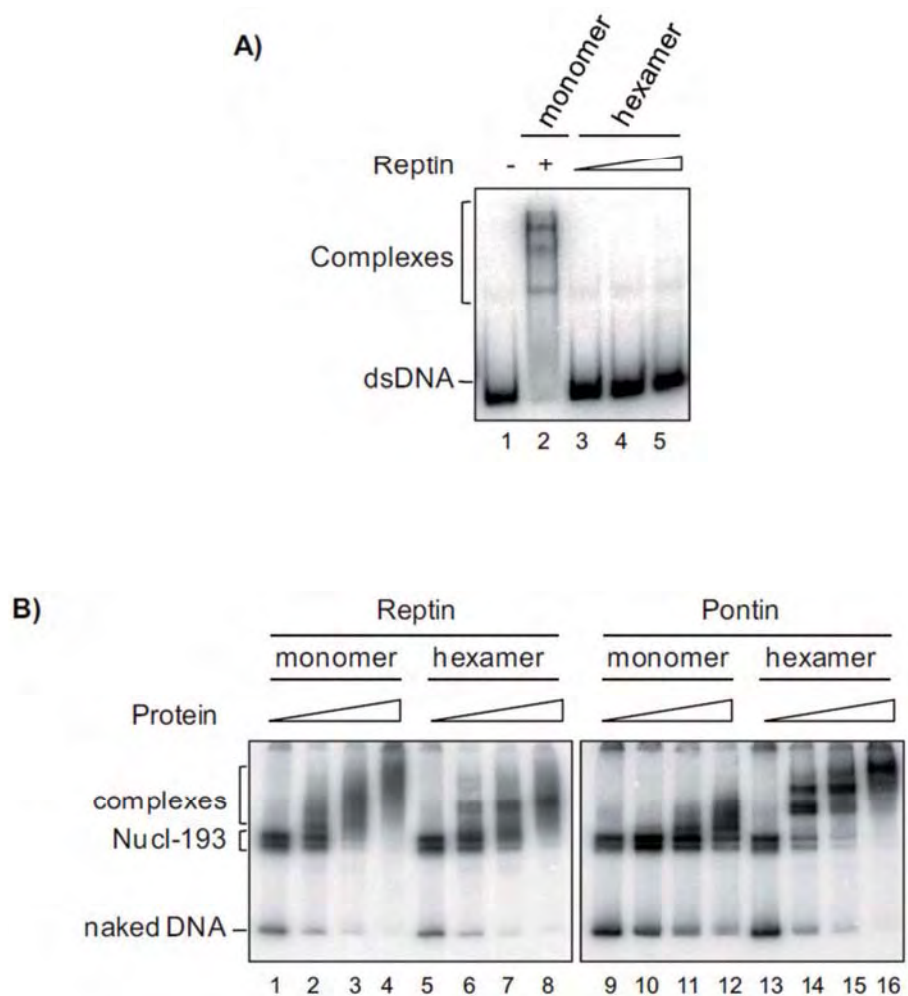


Figure S4: Binding properties of monomers and hexamers

A) Binding capacity on ds-115 of purified Reptin monomers (0.6 μ M, lane 2) and hexamers (0.5 μ M, 0.75 μ M, and 1 μ M, lanes 3, 4 and 5 respectively) was compared in EMSA. **B)** EMSA was performed on DNA nucleosome substrates (nucl-193) either with purified monomers (lanes 2-4 and 10-12) or hexamers (lanes 6-8 and 14-16) of Reptin and Pontin at increasing concentrations (0.3, 0.6 and 0.9 μ M).

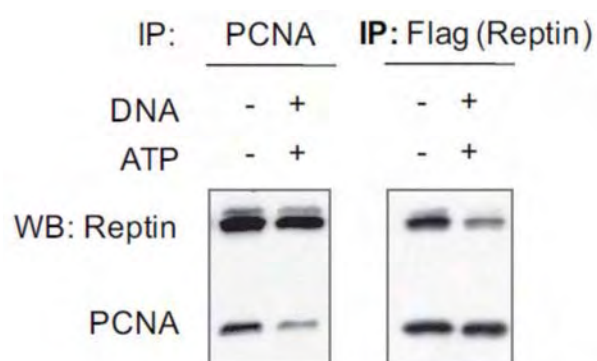


Figure S5: Reciprocal interaction between Reptin and PCNA in Pull-Down assay

Pull-down experiments were performed with either Reptin (left) or PCNA (right) as bait. Bait and prey (0.5 μ M) were mixed together for 1 h at 37°C. When indicated, Reptin was preincubated with ssDNA (ssM13, 10 μ g/ml), and treated with ATP (1 mM), for 30 min at 37°C. Protein complexes were trapped on magnetic beads coupled to anti-Flag or anti-PCNA. Results were analyzed by Western Blotting.

II) L'activité hélicase des protéines Pontin et Reptin est-elle suffisante pour déstabiliser un nucléosome ?

A) Question posée et démarches expérimentales

Nous avons montré que les protéines Pontin et Reptin se complexent sur un nucléosome. De plus, nous montrons que les extrémités N-terminales de l'histone H3 modulent les activités, ATPase et hélicase, des protéines Pontin et Reptin. Il est possible que ces protéines puissent à leur tour affecter la structure du nucléosome. Particulièrement, nous pouvons supposer que Pontin et Reptin puissent déstabiliser les contacts histones-ADN au sein d'un nucléosome pour faciliter les activités d'échange d'histones ou de glissement/éviction d'octamères d'histones exécutées par les complexes de remodelage de la chromatine auxquels elles appartiennent (Voir dans l'introduction de ce manuscrit : Chapitre 2, I) Les protéines Pontin et Reptin associées au remodelage chromatinien).

Nous avons particulièrement porté notre attention sur l'activité hélicase de Pontin et Reptin. En effet, plusieurs hélicases ont été identifiées pour déstabiliser des complexes ADN-protéines (Mackintosh et Raney, 2006). Ainsi, nous pouvons supposer que les contraintes appliquées à l'ADN pendant le mécanisme de déroulement d'ADN par les protéines Pontin et Reptin puissent se traduire par la rupture des contacts histones-ADN sur le nucléosome se traduisant par un glissement de l'octamère sur l'ADN ou par son éviction. Le glissement ou l'éviction d'octamères se visualise aisément sur gel natif ou le profil de migration de l'ADN est représentatif de la position de l'octamère d'histones sur cet ADN, ou de son absence.

Pour tester cette hypothèse, nous avons adapté nos mononucléosomes, décrit dans l'article précédent, pour qu'ils puissent engager l'activité hélicase des protéines Pontin et Reptin. En effet, notre laboratoire a préalablement défini les conditions adéquates pour visualiser cette activité (Papin *et al.*, 2010). Pontin et Reptin ne peuvent dérouler de l'ADN que sur un substrat ADN hemiduplex contenant une extrémité 3' simple brin d'au moins trente nucléotides (nt). Nous avons donc ajouté au fragment d'ADN portant la séquence de positionnement de nucléosome une extrémité 3' sortante de trente nucléotides et utilisé ce fragment pour reconstituer des mononucléosomes.

Nos résultats, présentés dans l'article précédent, montrent que les protéines Pontin et Reptin interagissent avec l'extrémité N-terminale de l'histone H3. Pour étudier l'effet de cette

queue d'histone sur l'activité hélicase de Pontin et Reptin dans un contexte de nucléosome, nous avons reconstitué des nucléosomes pourvus ou dépourvus d'extrémités N-terminale d'H3.

B) Matériels et méthodes

Construction du fragment d'ADN portant la séquence de positionnement de nucléosome complétée par une extrémité d'ADN simple brin 3' sortante : Pour obtenir un fragment d'ADN contenant la séquence de positionnement de nucléosome et une extrémité 3' simple brin de trente nt, nous avons introduit un site de reconnaissance pour la nucléase Nt.BstNBI sur le plasmide pUC18 contenant la séquence de positionnement. Sur ce plasmide, un fragment d'ADN de 193pb a été synthétisé par PCR (**voir Figure 25A**). Le fragment d'ADN est purifié sur gel et les extrémités sont marquées radio-activement par T4 polynucléotide kinase (Promega) en utilisant de l'ATP[γ -³²P]. L'ADN est ensuite digéré, ou non, par l'enzyme Nt.BstNBI suivant les conditions du fournisseur (NEB). Puis, incubation de 10 minutes à 70°C du fragment digéré après ajout d'oligonucléotides complémentaires des fragments néoformés par l'enzyme Nt.BstNBI, dans un ratio molaire (oligonucléotide sur fragment digéré) de 20. Le mélange est ensuite aussitôt appliqué sur Illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns (GE Healthcare).

Retardement sur gel par la protéine SSB (Single Strand Binding protein) : Dans un volume réactionnel de 10 μ l, contenant 25 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 2.5 mM Mg(CH₃COO)₂, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 100 μ g/ml BSA (Sigma), 5% de glycerol, 1 ng d'ADN de positionnement de nucléosome radio-marqué, digéré par Nt.BstNBI, ou non digéré, est incubé avec 0, 10, 50, 100, 250, 500 ou 1000 ng de protéine SSB (USB) pendant 20 minutes à 4°C. La formation du complexe entre l'ADN et la protéine SSB est visualisée par gel polyacrylamide (37,5:1) 6% non-dénaturant avec pour tampon de migration TBE 1X. Les gels sont séchés et révélés par Fuji BAS 3000 phosphorimager (Fuji Life Science, Tokyo, Japan).

Reconstitutions de mononucléosomes contenant une extrémité 3' simple brin de trente nucléotides : Les reconstitutions de nucléosomes ont été réalisées comme cela a été décrit dans l'article précédent avec pour différence l'utilisation d'un fragment d'ADN hemiduplex.

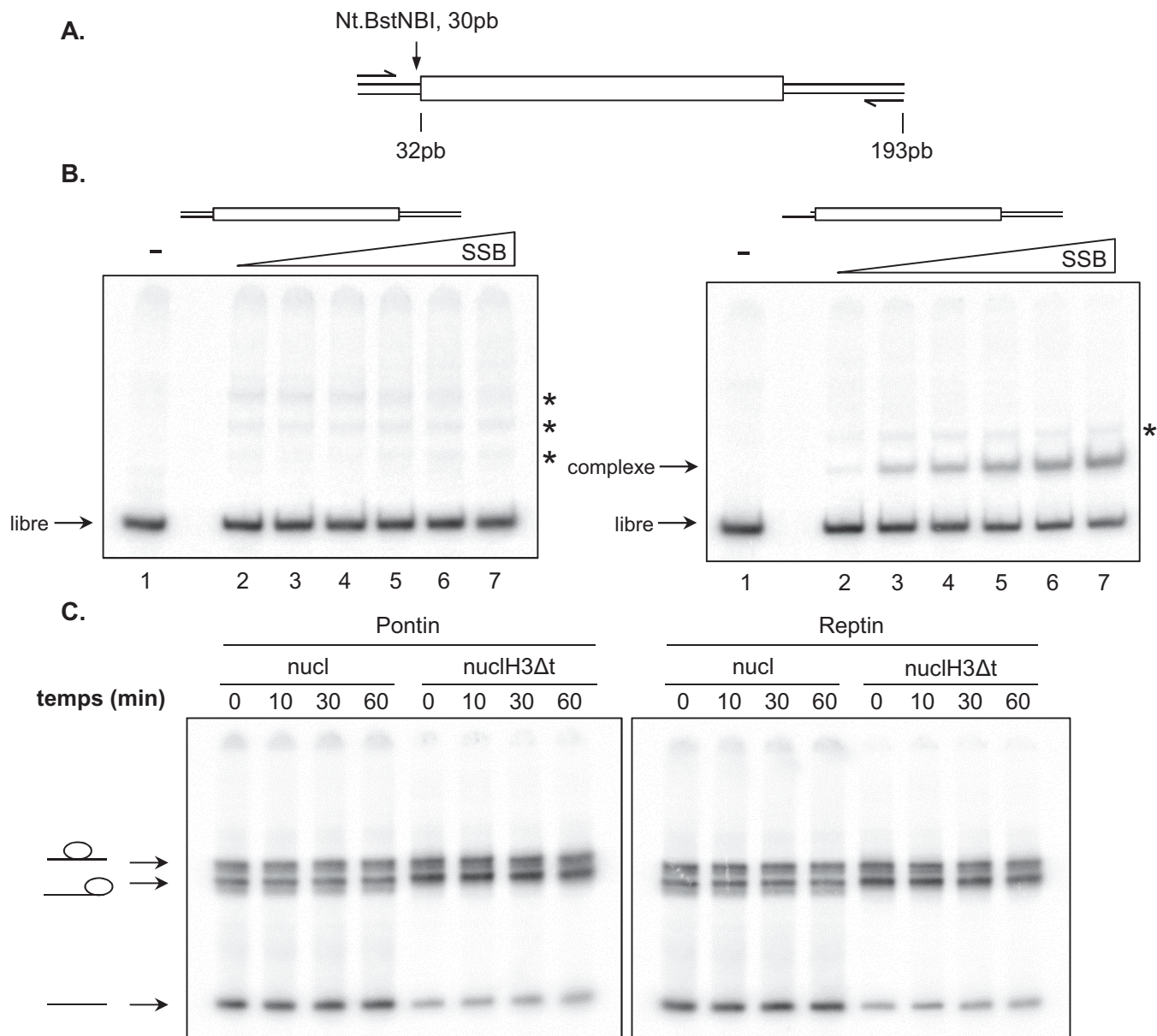


Figure 25 : Activité hélicase sur un substrat nucléosomal. **A.** Représentation schématique du fragment d'ADN utilisé pour les reconstitutions de nucléosome. Un brin d'ADN est représenté par un trait, le rectangle représente la séquence de positionnement du nucléosome. La position des amorces utilisées pour l'amplification de la séquence est marquée à chaque extrémité de l'ADN. La localisation du site de digestion de l'enzyme Nt.BstNBI est indiquée par une flèche. **B.** La présence de l'extrémité simple brin 3' sortante sur le fragment d'ADN est vérifiée en comparant l'affinité de liaison à l'ADN de la protéine SSB les fragments d'ADN radio-marqués non digéré par l'enzyme Nt.BstNBI (panneau de gauche) ou digéré par l'enzyme Nt.BstNBI (panneau de droite). Les fragments d'ADN sont schématisés au-dessus des gels. Ces gels représentatifs montrent que SSB forme un complexe spécifique avec l'ADN digéré par Nt.BstNBI (indiqué par une flèche à gauche du panneau de droite) lorsque l'on augmente la concentration de SSB : 0 ng (piste 1) et de 10 à 1000 ng (piste 2 à 7). Sur la gauche des gels, est indiquée par une flèche la position des fragments d'ADN non complexés avec la protéine SSB. Les astérisques indiquent des complexes mineurs qui sont sûrement le résultat de l'affinité, bien que moindre, de la protéine SSB pour l'ADN double brin. **C.** Les mononucléosomes ont été reconstitués avec les fragments d'ADN portant l'extrémité 3' sortante soit avec les histones pleines tailles (nucl) soit dépourvues de leurs extrémités N-terminales d'H3 (nuclH3Δt). Ces deux types de nucléosomes servent de substrats dans une expérience visant à mesurer l'effet de l'activité hélicase des protéines Pontin (panneau de gauche) ou Reptin (panneau de droite) sur ces nucléosomes au cours du temps. Des représentations schématiques des types d'ADN (un trait pour l'ADN, un cercle creux pour la particule nucléosomale) indiquent leur position dans le gel sur la gauche des gels.

Tests hélicases : Les tests hélicases ont été réalisés comme cela a été décrit dans un précédent article (Papin *et al.*, 2010). Brièvement, nous avons utilisé comme substrats les nucléosomes reconstitués sur le fragment d'ADN contenant la séquence de positionnement et une extrémité 3' simple brin. La réaction a été réalisée avec 0,5 nM de substrat nucléosomal, 100 nM de Pontin ou Reptin dans un tampon contenant 25 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 2.5 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0.2 mM DTT, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA (Sigma) et 1mM d'ATP.

C) Résultats et discussions

Préparation et caractérisation de l'ADN portant une extrémité 3' sortante de 30 nucléotides. Pour obtenir de grande quantités de fragments d'ADN contenant une séquence de positionnement, nous avons amplifié ce fragment par PCR à partir du plasmide contenant sa séquence (Grigoriev et Hsieh, 1997). Nous avons vu précédemment qu'un bon substrat ADN pour étudier les différentes activités enzymatiques des protéines Pontin et Reptin doit posséder une extrémité simple-brin 3' sortante d'au moins trente nucléotides (Papin *et al.*, 2010). Pour obtenir cet ADN particulier, nous avons introduit un site de reconnaissance pour l'enzyme Nt.BstNBI sur le plasmide contenant la séquence de positionnement. Nous avons placé ce site de telle sorte qu'il soit à une distance de 30 nt d'une extrémité 5' du fragment à amplifier par PCR. Cette enzyme Nt.BstNBI a la particularité de créer des interruptions monocaténares. Après digestion enzymatique du fragment obtenu par PCR, le fragment est dénaturé à 70°C en présence d'un large excès d'oligonucléotides pièges pour les fragments générés par Nt.BstNBI, puis l'extrait est purifié pour éliminer ces courtes molécules ADN simple et double brin néoformées (voir Matériels et Méthodes). Le fragment d'ADN obtenu est un hemiduplexe contenant une extrémité simple brin de 30nt en 3' et une partie double brin de 173 pb (**Figure 25A**). En parallèle, un même fragment généré par PCR ne subit pas la digestion enzymatique afin de conserver des extrémités franches. Il était indispensable de s'assurer de la présence de l'extrémité simple brin. Pour ce faire, nous avons utilisé l'affinité de la protéine SSB (Single Strand Binding protein) pour l'ADN simple brin dans des expériences de retard sur gel. Sur la **Figure 25B**, l'expérience de retard sur gel présentée permet d'observer la formation d'un complexe spécifique entre SSB et notre substrat portant l'extrémité simple brin (panneau de gauche, flèche pleine noire annotée complexe), alors que le fragment aux extrémités franches ne présente pas de complexe spécifique avec SSB

(panneau de droite). Ce résultat confirme que l'échantillon d'ADN traité à l'enzyme Nt.BstNBI contient des fragments d'ADN avec des extrémités simple brin d'ADN.

Déstabilisation de nucléosomes portant une extrémité 3' sortante simple brin par l'activité hélicase des protéines Pontin ou Reptin. Les fragments d'ADN contenant la séquence de positionnement de nucléosome et portant une extrémité 3' d'ADN simple brin nous permettent de reconstituer des nucléosomes capables d'engager l'activité hélicase des protéines Pontin et Reptin. Comme ces protéines interagissent avec l'extrémité N-terminale de l'histone H3, nous avons choisi d'étudier l'influence de l'activité hélicase de ces protéines sur les nucléosomes possédant (nucl) ou non (nuclH3Δt) des extrémités N-terminales d'H3. Le nucléosome nucl (0,5 nM) ou le nucléosome nuclH3Δt a été incubé dans le mélange de réaction contenant 100 nM de Pontin ou Reptin et 1 mM d'ATP. 100 nM de Pontin ou Reptin n'est pas suffisant pour former un complexe avec 0,5 nM de substrat nucléosomal (voir l'article présenté précédemment **Figure 1A-1B**).

La cinétique de réaction présentée **Figure 25C** ne révèle aucun changement dans le positionnement de l'octamère sur l'ADN, que ce soit pour Pontin ou Reptin sur les nucléosomes avec ou sans extrémité N-terminale d'H3, même après une heure de réaction.

Il est possible que l'activité hélicase des protéines Pontin et Reptin n'engage simplement pas suffisamment de contraintes sur l'ADN pour rompre les interactions entre les histones et l'ADN. Toutefois, il est difficile de conclure sur la base de cette simple expérience. De multiples raisons peuvent expliquer l'absence d'effet de l'activité hélicase de Pontin ou Reptin sur la stabilité de nos nucléosomes.

Une raison technique peut expliquer ce résultat négatif. Notre système pour évaluer la présence de l'extrémité simple brin sur l'ADN extranucléosomal n'est pas très efficace. En effet, nous observons que la protéine SSB forme un complexe spécifique avec les fragments d'ADN digérés par Nt.BstNBI, mais cette méthode ne permet pas d'évaluer l'efficacité de la digestion. Il est envisageable qu'il n'y ait qu'une faible quantité d'ADN portant effectivement une extrémité 3' simple brin, empêchant ainsi d'observer l'effet de l'activité hélicase de Pontin ou Reptin sur les nucléosomes. Un moyen plus efficace de vérifier si les fragments d'ADN contiennent bien une extrémité 3' simple brin serait d'utiliser une enzyme de restriction ayant un site de reconnaissance sur la région simple brin.

La construction du fragment d'ADN est également discutable. Comme représenté sur la **Figure 25A**, la partie monocaténaire de notre ADN juxtapose la séquence de positionnement de nucléosome. Cette disposition risque de positionner l'octamère d'histones à proximité immédiate de l'extrémité simple brin, limitant son accès aux protéines Pontin et Reptin. Notons également que l'efficacité de déroulement de brin de ces protéines est dépendant de la taille de l'ADN simple brin (Papin *et al.*, 2010). En effet, plus l'extrémité simple brin est grande, plus les protéines Pontin et Reptin vont dérouler efficacement la région duplex. Augmenter la taille de l'ADN simple brin sur nos substrats nucléosomal pourrait faciliter le déroulement d'ADN au travers des nucléosomes. De plus, les travaux de notre équipe (Papin *et al.*, 2010, résultats non montrés) révèlent également que la taille de l'ADN duplex des substrats ADN jouent un rôle important dans l'efficacité de ces enzymes à dérouler un ADN duplex. Ce mécanisme suppose une interaction provisoire entre l'enzyme et la partie duplex du substrat à dérouler. Ce processus a été clairement mis en évidence pour la protéine UvrD (Lee et Yang, 2006) grâce aux données structurales obtenues pour cette protéine complexée à un ADN contenant à la fois une partie monocaténaire et une partie duplex. Pour nos substrats, si l'octamère d'histones est positionné à l'extrémité de la partie duplex, opposé à la partie simple brin, la taille de l'ADN extranucléosomal double brin disponible est au maximum de vingt paires de base. Cette taille est sans doute insuffisante pour que les protéines Pontin et Reptin puissent générer la force nécessaire à la déstabilisation du nucléosome.

Les séquences de positionnement de nucléosomes classiquement utilisées en laboratoire, telle que la séquence 5S de l'ADN ribosomique ou les séquences artificielles comme la séquence de positionnement 601 ou celle que l'on utilise dans nos expériences, le motif TG, force la localisation des nucléosomes comparé à l'ADN natif *in vivo* (Thåström *et al.*, 1999). Il est donc possible que l'effet potentiel des protéines Pontin et Reptin sur la stabilité des nucléosomes soit masqué par cette forte association entre l'octamère et notre ADN de positionnement. Pour augmenter la mobilité du nucléosome, nous pourrions changer de séquence de positionnement et/ou diminuer les interactions histones ADN en éliminant toutes les extrémités N-terminales d'histones ou en hyper-acétylant les histones (Brower-Toland *et al.*, 2005 ; Nurse *et al.*, 2013 ; Widlund *et al.*, 2000).

Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous avons mis en évidence un mécanisme à l'échelle moléculaire très particulier pour les protéines Pontin et Reptin. Si les travaux précédents de l'équipe montrent que leurs activités enzymatiques, sous leur forme monomérique, sont dépendantes de l'ADN (Papin *et al.*, 2010), nous montrons maintenant que ces activités peuvent être modulées par la forme structurée de l'ADN *in vivo*, le nucléosome. En effet, nous observons que Pontin et Reptin peuvent former un complexe avec des nucléosomes, sur l'ADN extranucléosomal. De plus, nous leur découvrons un nouveau partenaire, l'histone H3. Nous montrons clairement qu'elles interagissent spécifiquement avec cette histone et plus précisément avec son extrémité N-terminale. De façon intéressante, cette interaction est sensible aux modifications post-traductionnelles. Lorsque l'extrémité N-terminale de l'histone H3 est acétylée, l'interaction est perdue alors qu'elle est maintenue lorsque cette extrémité est méthylée. Parmi ces modifications post-traductionnelles, celles induisant une interaction vont moduler les activités enzymatiques de Pontin et Reptin. Ainsi, la non-modification ou la méthylation de l'extrémité N-terminale d'H3 inhibe les activités enzymatiques de Pontin et Reptin, tel que l'activité ATPase. De manière intéressante, cette inhibition est corrélée à un effet positif sur le passage d'une forme monomérique à une forme hexamérique de Pontin et Reptin. Parallèlement, nous montrons que les protéines Pontin et Reptin n'interagissent pas avec les mêmes partenaires suivant qu'elles soient sous leurs formes monomérique ou hexamérique.

Ces résultats permettent, pour la première fois, de relier les propriétés enzymatiques des protéines Pontin et Reptin à leurs fonctions cellulaires. Nous proposons un modèle dans lequel ces protéines sont un lien dynamique entre la chromatine et leurs différents co-facteurs. Tout d'abord, les protéines Pontin et Reptin interagissent avec la chromatine sur l'ADN. Ainsi, à proximité de nucléosomes elles peuvent interagir directement avec l'extrémité N-terminale de l'histone H3, formant un complexe ternaire dynamique avec l'ADN et l'histone H3. Cette dynamique est gouvernée par les modifications post-traductionnelles que porte cette histone. Suivant ces modifications, l'interaction entre Pontin ou Reptin et l'histone va être perdue ou maintenue, ce qui est corrélé avec un changement d'état oligomérique de Pontin ou Reptin. Suivant leur état oligomérique, les protéines Pontin et Reptin vont alors engager différentes interactions avec leurs partenaires protéiques.

Notre modèle *in vitro* méritera d'être complété sur principalement deux points. Premièrement, l'existence du complexe ternaire Pontin/Reptin, ADN et histone H3 est intuitivement déduit de la démonstration que les protéines Pontin et Reptin interagissent

physiquement avec l'extrémité N-terminale de l'histone H3 seule et d'autre part, parce que l'ADN extranucléosomal n'est pas suffisant pour expliquer la stabilisation des protéines Pontin et Reptin sur un nucléosome possédant de court bras d'ADN. Ces résultats suggèrent que l'histone H3 doit stabiliser ces protéines sur les nucléosomes. Pourtant, lorsque nous avons étudié l'interaction de Pontin et Reptin sur des nucléosomes dépourvus d'extrémités N-terminales d'H3, aucune diminution d'affinité des protéines Pontin et Reptin pour ce type de nucléosome n'a pu être observée (résultats non montré). L'explication la plus évidente est de considérer que l'absence des extrémités N-terminales d'H3 facilite l'accès à l'ADN nucléosomal pour nos protéines. De façon indirecte, nous pourrions démontrer ce complexe ternaire en étudiant la stabilité du complexe Pontin ou Reptin/nucléosome avec ou sans extrémité N-terminale d'H3 vis-à-vis de compétiteur ADN double brin. Si H3 stabilise Pontin et Reptin sur le nucléosome, alors le complexe Pontin ou Reptin/nucléosome doit être plus résistant à l'ajout d'ADN compétiteur qu'un complexe Pontin ou Reptin/nucléosome dépourvu d'extrémités N-terminales d'H3.

Le deuxième point clef à démontrer est l'étude de la dynamique d'assemblage oligomérique des protéines Pontin et Reptin et ce, directement sur le nucléosome. Cette démonstration nécessite de définir les interactions entre les multiples formes oligomériques des protéines Pontin et Reptin (hexamère, dodécamère, formes homo- et hétéro-mériques) vis-à-vis de l'ADN, des histones et du nucléosome. Puis, il faudra visualiser le changement d'état oligomérique des protéines Pontin et Reptin sur le nucléosome. Cette visualisation pourrait se faire directement par l'observation en microscopie électronique de complexes contenant les monomères de Pontin ou Reptin sur un nucléosome, portant des modifications post-traductionnelles ou non avec ou sans co-facteurs nucléotidiques.

Bien qu'incomplet, notre modèle est suffisamment pertinent pour proposer un mécanisme fonctionnel expliquant le rôle des protéines Pontin et Reptin dans les connections entre la chromatine et ses partenaires. Ainsi, il me semble particulièrement important de développer nos futures recherches dans le but de valider *in vivo* ce modèle. Pour ce faire, je propose d'orienter ces recherches dans trois directions : **I°)** déterminer l'association des protéines Pontin et Reptin sur l'ADN *in vivo*, **II°)** valider que les extrémités N-terminale des histones et leurs modifications post-traductionnelles puissent conditionner, par l'intermédiaire de Pontin et Reptin, le recrutement de facteurs protéiques. **III°)** démontrer que les différents

états oligomériques des protéines Pontin et Reptin soient responsables du recrutement et/ou de l'assemblage de leurs différents partenaires.

Pour résoudre ces problèmes, le moyen le plus efficace serait de disposer d'une batterie de mutants qui ne permettent plus l'association à l'ADN, l'interaction avec les extrémités N-terminales des histones ou l'oligomérisation.

- Mutants d'interaction avec l'ADN.

Notre laboratoire a initié des travaux visant à évaluer de manière approfondie les propriétés de liaison à l'ADN des protéines Pontin et Reptin. Ces études autorisent à rechercher une similarité structurale avec une protéine de la recombinaison bactérienne RecA. En effet, Pontin, Reptin et RecA semblent avoir les mêmes propriétés de liaison à l'ADN, c'est-à-dire la capacité à se lier à de l'ADN simple ou double brin, l'existence d'un double site de liaison à l'ADN, et l'affinité pour de l'ADN étiré (Résultats non montrés, Odile Humbert). Les sites de liaison à l'ADN de RecA ont été localisés sur deux boucles non structurées (**Figure 26**) (Chen et al., 2008 ; Malkov et Camerini-Otero, 1995 ; McGrew et Knight, 2003 ; Wang et Adzuma, 1996). La modélisation moléculaire des protéines Pontin et Reptin réalisée par Petukhov *et al.* (2012) suggère que ces protéines possèdent deux boucles (L1 et L2) dans une topologie similaire à celle de RecA. L'une de ces boucles (L1) est portée par le domaine putatif de liaison à l'ADN, l'OB-fold (Matias *et al.*, 2006). Ces observations nous ont permis de supposer que les acides aminés présents dans ces boucles L1 et L2 pouvaient être responsable des propriétés de liaison à l'ADN des protéines Pontin et Reptin. Notre laboratoire (Odile Humbert et Adilia Dagkessamanskaja) a construit des mutants de délétion de ces boucles sur Pontin et initié leurs caractérisations biochimiques. Si la délétion de L1 semble empêcher la fixation à l'ADN de Pontin, la délétion de L2 modifie le profil de migration de complexe Pontin/ADN par rapport à la protéine sauvage (Résultats non montrés). Ces données préliminaires suggèrent que la délétion de ces boucles puisse définir des mutants d'interaction avec l'ADN.

- Mutants d'interaction avec les extrémités N-terminales des histones

Nous avons démontré que les protéines Pontin et Reptin interagissent avec l'extrémité N-terminale de l'histone H3, l'analyse par spectrométrie de masse de produits de digestion tryptique, générés dans des expériences de protéolyse ménagée en présence d'extrémités N-terminales de l'histone H3 (cross-linkés) pourrait nous conduire à définir précisément les sites

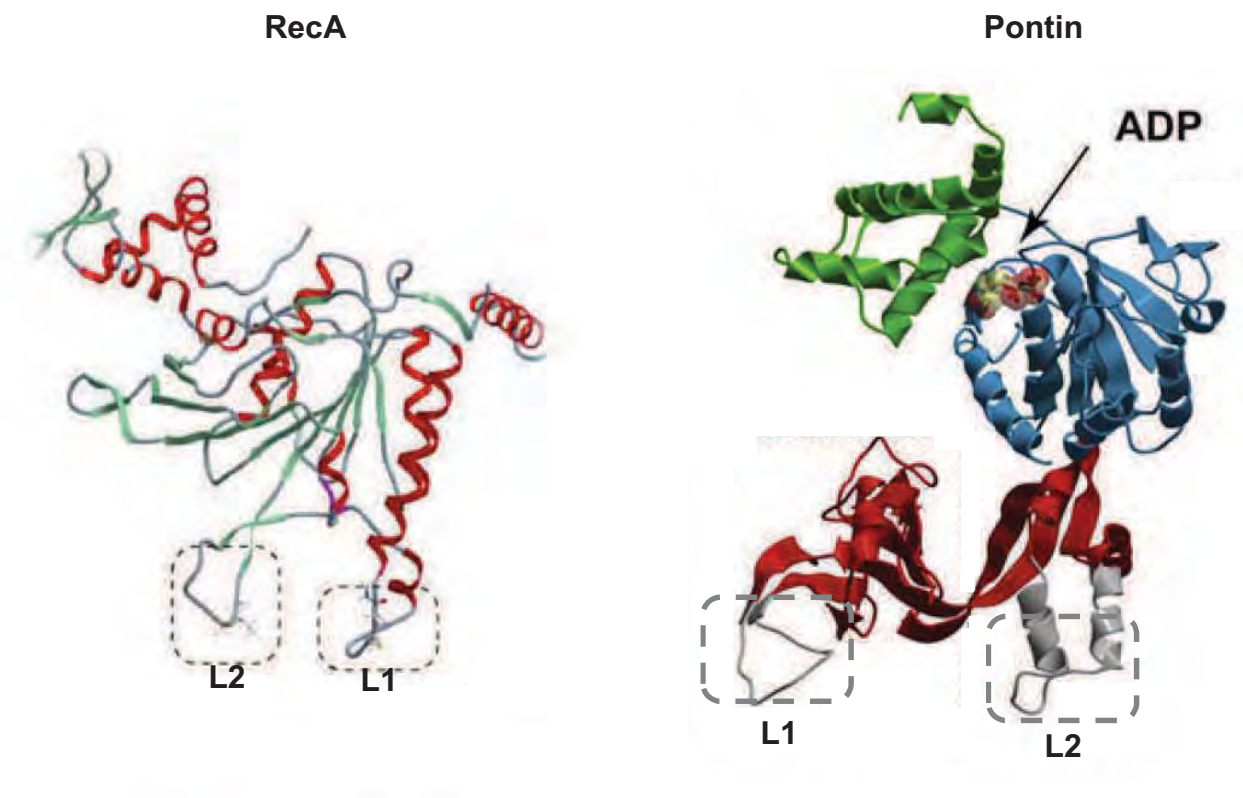


Figure 26. Comparaison entre RecA et Pontin. RecA, à gauche, est représentée en ruban. Les hélices alpha sont colorées en rouge, les feuillets beta en vert et les régions non-structurées en gris. La structure cristallographique de hPontin est représentée à droite (Matias *et al.*, 2006). Les domaines DI, DII et DIII sont colorés respectivement en bleu, rouge et vert. Les boucles non-structurées, déterminées par Petukhov *et al.* (2012) sont colorées en gris. Les rectangles en pointillés identifient les boucles L1 et L2 sur Pontin et RecA. La molécule d'ADP à l'interface entre DI et DIII de hPontin est indiquée par une flèche.

Pour Pontin, d'après Petukhov *et al.* (2012) *Structure* **20** : 1321–1331

d'interactions entre ces partenaires, afin de concevoir des mutants d'interaction avec l'histone H3.

Notons qu'une telle expérience a été menée sur le complexe INO80 de levure, contenant un dodécamère de Pontin et Reptin, en interaction avec un nucléosome (Tosi *et al.*, 2013). En accord avec nos résultats, cette étude met en évidence que yPontin et yReptin interagissent avec l'extrémité N-terminale de l'histone H3. Par contre, contrairement à nous, Tosi *et al.* observent également que yPontin interagit avec H2B et H2A, et que yReptin interagit avec tous les histones canoniques. Etant donné le haut niveau de conservation entre les protéines humaines et celles de levures, il est peu probable que ces différences entre nos travaux soit le reflet de spécificités d'espèces. Par contre, dans notre travail, nous n'avons utilisé que les formes monomériques de Pontin et Reptin. Il est possible que suivant leur état oligomérique, elles n'interagissent pas avec le même jeu d'histones. Toutefois, l'explication la plus probable est de considérer que nos expériences ne soient pas suffisamment sensibles pour visualiser toutes ces interactions.

En extrapolant les données obtenues chez la levure, nous pourrions faciliter la recherche d'acides aminés clefs pour les interactions entre Pontin ou Reptin et les histones chez l'homme.

- Mutants d'oligomérisation

L'analyse détaillée des différentes structures cristallographiques obtenues pour Pontin et Reptin, homo-hexamères (Matias *et al.*, 2006 ; Petukhov *et al.*, 2012) ou hétéro-dodécamère (Gorynia *et al.*, 2011), pourrait nous permettre d'identifier quels sont les acides aminés responsables des interactions inter-protomériques.

Ces mutants pourront être évalués dans des modèles cellulaires, par transfection transitoire, et/ou après déplétion (siRNA) des protéines endogènes, pour leurs effets sur les phénotypes définis ci-après:

I°) Déterminer l'association des protéines Pontin et Reptin sur l'ADN *in vivo*.

L'affinité pour l'ADN des protéines Pontin et Reptin et leur présence sur de nombreux promoteurs laissent supposer qu'elles puissent interagir avec la région dépourvue de nucléosomes (NFR pour « Nucleosome Free Region ») que l'on retrouve sur la quasi-totalité des gènes eucaryotes (Jiang et Pugh, 2009 ; Rando et Chang, 2009). Démontrer leur présence

sur le NFR permettrait de renforcer notre modèle dont la première étape est la fixation des protéines Pontin et Reptin sur l'ADN extranucléosomal. Pour visualiser cette interaction nous pourrions réaliser une expérience de séquençage d'ADN, obtenu suite à une ChIP (ChIP-seq) contre Pontin ou Reptin, en ciblant les NFRs.

Cependant, cette expérience a été réalisée sur plus de 4900 gènes chez la levure par Yen *et al.* (2013). Les auteurs observent alors que les protéines yPontin et yReptin sont associées au premier nucléosome après le site initiateur de la transcription (N+1), mais pas sur le NFR. Ces résultats semblent *a priori* incompatibles avec notre modèle. Toutefois, cet enrichissement des protéines Pontin et Reptin sur le N+1 est très probablement le reflet de leur association avec les complexes de remodelage SWR1 et INO80, dont toutes les sous-unités sont retrouvées autour de ce nucléosome N+1 (Yen *et al.*, 2013). Ces deux complexes sont responsables de l'insertion et du retrait de l'histone H2A.Z (Htz1 chez la levure) que l'on retrouve, entre autre, sur le nucléosome N+1 (Mizuguchi *et al.*, 2004 ; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011). Parallèlement, parce que l'affinité du complexe SWR1 est plus importante pour l'ADN que pour une particule nucléosome, Ranjan *et al.* (2013) proposent que le ciblage du complexe SWR1 sur le nucléosome N+1 est dans un premier temps permis par la haute affinité de ce complexe pour l'ADN libre et donc pour le NFR, puis dans un second temps par la reconnaissance de modifications post-traductionnelles sur le nucléosome N+1 (Ranjan *et al.*, 2013). Nos travaux permettent de supposer que les protéines Pontin et Reptin puissent être responsables du recrutement de SWR1 sur le NFR. Puis, suite à un changement d'état oligomérique, elles décrocheraient de l'ADN pour faciliter l'engagement de ce complexe sur le nucléosome N+1. Une alternative pour observer l'association de nos protéines avec le NFR serait d'utiliser des mutants d'oligomérisation. Ainsi, les protéines Pontin et Reptin devraient être séquestrées sur le NFR.

Enfin, une autre alternative serait de montrer indirectement que la fixation des protéines Pontin et Reptin à l'ADN est un prérequis pour le recrutement de leurs partenaires. Par une combinaison de ChIP nous pourrions identifier les facteurs recrutés en présence des protéines Pontin et Reptin sauvages ou mutantes pour la fixation à l'ADN, sur différents promoteurs caractérisés. Par exemple, nous pourrions étudier le recrutement des complexes SWR1 et INO80 sur le nucléosome N+1 chez la levure. Ou encore le promoteur du gène suppresseur de tumeur *KAI1* dont la régulation, bien décrite, dépend du rôle dynamique de

complexes de remodelage de la chromatine, du facteur de transcription β -caténine et des protéines Pontin et Reptin (Kim *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2006).

II°) L'interaction avec les queues d'histones conditionne le recrutement de leurs partenaires.

La seconde étape de notre modèle propose que la dynamique de recrutement des partenaires de Pontin et Reptin soit contrôlée par leur interaction avec les extrémités N-terminales des histones. Bloquer cette interaction en utilisant les mutants d'interactions décrits ci-dessus devrait se traduire par un défaut de recrutement de leurs co-facteurs sur des promoteurs caractérisés.

Les extrémités N-terminales des histones et leurs modifications post-traductionnelles forment une source potentiellement importante de facteurs permettant le contrôle des propriétés enzymatiques des protéines Pontin et Reptin et donc de leurs fonctions cellulaires. Il serait donc intéressant de trouver d'autres extrémités N-terminales d'histones, et/ou modifications d'histones, partenaires de Pontin et Reptin. Une possibilité serait, par ChIP-seq, de comparer la localisation sur l'ensemble du génome des protéines Pontin et Reptin avec la localisation des nombreuses modifications post-traductionnelles des histones déjà identifiées. Toutefois, les protéines Pontin et Reptin appartiennent à de nombreux complexes dont certaines sous-unités possèdent des domaines de reconnaissance de modifications post-traductionnelles des histones, risquant de parasiter les signaux obtenus. Il me semble donc nécessaire, au moins en parallèle de la ChIP-seq, de déterminer les interactions directes entre les protéines Pontin et Reptin et les extrémités N-terminales des histones modifiées ou non en utilisant une puce à peptides comprenant l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones.

III°) Le changement d'état oligomérique conditionne l'interaction avec différents partenaires

Nous avons démontré que différents assemblages oligomériques, monomères ou hexamères, co-immuno-précipitent différents co-facteurs, suggérant que les protéines Pontin et Reptin puissent agir comme plateforme de recrutement modulable de leurs partenaires. Dans ce système, la sélection de ces partenaires dépendrait de leur état oligomérique. Cette hypothèse est appuyée par l'analyse récente de la structure tridimensionnelle des complexes INO80 et SWR1 de levure (Nguyen *et al.*, 2013 ; Tosi *et al.*, 2013). Dans ces complexes, Pontin et Reptin sont retrouvées sous forme dodécamérique au sein d'INO80 tandis qu'elles sont sous forme hexamérique au sein de SWR1.

Une combinaison d'immuno-précipitation et de ChIP sur des promoteurs caractérisés, en utilisant des mutants d'oligomérisation nous permettra d'analyser l'implication de ces différents états oligomériques dans l'assemblage et le recrutement des partenaires de Pontin et Reptin.

En conclusion, notre hypothèse propose un moyen de contrôler l'assemblage et/ou le recrutement des co-facteurs des protéines Pontin et Reptin en modulant leur état oligomérique. Cette idée peut probablement se généraliser à d'autres processus requérant Pontin et Reptin. Par exemple, le rôle de ces protéines dans la réparation des cassures double brin pourrait être de coordonner le recrutement des complexes de remodelage TIP60, INO80 et SWR1. Après une cassure double brin, la chromatine est décondensée, permettant aux protéines de la réparation d'accéder à l'ADN. Potentiellement, cette ADN accessible peut être une cible pour le chargement des monomères de Pontin et Reptin. De plus, les cassures double brin entraînent une dynamique de modifications post-traductionnelles des histones autour des CDB. Ces modifications orchestrent le recrutement de nombreuses protéines de la réparation (Shi et Oberdoerffer, 2012). Elles ont donc le potentiel pour contrôler l'état oligomérique des protéines Pontin et Reptin. Ainsi, la dynamique chromatinienne à proximité des cassures pourrait orienter l'activation et/ou le recrutement séquentiel des complexes TIP60, INO80 et SRCAP (SWR1) en modulant l'état oligomérique des protéines Pontin et Reptin.

Alternativement, si nous proposons que les modifications post-traductionnelles des histones peuvent moduler l'état oligomérique des protéines Pontin et Reptin et, de cette façon, modulent leurs interactions avec leurs partenaires protéiques, d'autres systèmes de régulation ont été observés dans la littérature. Ainsi, le groupe de Baek montre que des modifications post-traductionnelles sur Pontin et Reptin vont influencer leurs rôles dans la régulation transcriptionnelle (Kim *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2011).

Remarquons que ces modifications post-traductionnelles peuvent très bien, comme observé pour l'extrémité N-terminale d'H3 et ses modifications, influencer l'interactome de Pontin et Reptin en modulant leur état oligomérique. Par exemple, la sumoylation de Reptin sur la lysine 456 conditionne l'effet répressif de Reptin sur l'expression du gène *KAIL* (Kim *et al.*, 2006, voir le chapitre 2 de l'introduction, II) C) 4) Moduler la fonction transcriptionnelle des protéines Pontin et Reptin). Cette sumoylation permet d'augmenter l'affinité de Reptin pour HDAC1 ayant pour effet de réprimer le gène *KAIL* tandis que Reptin non-sumoylée recrute Tip60 et active l'expression de *KAIL*. L'ajout d'un groupement SUMO sur Reptin

pourrait empêcher son hexamérisation ou stabiliser Reptin sous sa forme monomérique, conduisant à son interaction avec HDAC1. En accord avec cette hypothèse, nous observons que HDAC1 et 2 co-immuno-précipitent avec la forme monomérique de Reptin (article présenté dans ce manuscrit, **Figure 6C**).

Pontin est également sumoylée, mais dans ce cas la sumoylation est importante pour l'induction de la transcription (Kim *et al.*, 2007). Cette dernière donnée suggère que le groupement SUMO ne dicte pas, en soi, le recrutement d'HDAC1 par Reptin plutôt que Tip60. Ainsi, l'affinité de Reptin sumoylée pour HDAC1 doit résulter d'un effet indirect du groupement SUMO, pouvant être supporté par un changement d'état oligomérique.

Certaines protéines, autres que les histones, peuvent également avoir un effet sur l'oligomérisation de Pontin et Reptin. Par exemple, les protéines APPL1 et 2 qui stimulent la voie wingless en bloquant l'interaction de Reptin avec β -caténine (Rashid *et al.*, 2009). Ou encore Hint1 qui, en interagissant avec Pontin et Reptin, inhibe leur interaction inter-protomérique et a un effet répressif sur la transcription des gènes cibles de la voie wingless (Weiske et Huber, 2005). Comme proposé pour la sumoylation, il est possible que maintenir les protéines Pontin et Reptin à l'état monomérique augmente l'affinité de Reptin avec HDAC1, renforçant l'effet co-répresseur de Reptin sur β -caténine.

Au-delà de la relation entre les protéines Pontin, Reptin et la chromatine que nous avons établi par notre travail, la dynamique d'assemblage des protéines Pontin et Reptin peut probablement affecter tous les processus dans lesquels ces protéines sont impliquées. Par exemple, le complexe R2TP peut-être plus dynamique que ce qui est communément proposé dans la littérature, au moins en ce qui concerne l'assemblage des snoRNPs. Comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, les protéines Pontin et Reptin sont le plus souvent considérées comme un hétéro-hexamère au sein du complexe R2TP. Les analyses des interactions entre les différents composants de ce complexe, que ce soit chez la levure ou chez l'homme (Boulon *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2008), conduisent à penser qu'HSP90 et Tah1 stabilisent Pih1 lui permettant de s'associer à l'hétéro-hexamère Pontin/Reptin. Une fois associée, Pih1 permettrait de recruter et stabiliser Tah1 pour former le complexe R2TP. Parce que chez les métazoaires, l'assemblage des snoRNPs est co-transcriptionnel (Kiss *et al.*, 2006), il est aussi possible que, dans une version étendue de notre modèle, l'hétéro-hexamère soit apporté suite à l'induction du gène porteur du snoARN. Cependant, l'analyse de la composition en protéines de snoRNPs à différents stades de maturations révèle que les

protéines Pontin et Reptin ne sont pas toujours présentes ensemble dans ce processus (Watkins *et al.*, 2004 ; Watkins *et al.*, 2007). Ainsi, il est envisageable que différents assemblages des protéines Pontin et Reptin puissent se faire pendant les différentes étapes de maturation des snoRNPs. Dans un système parallèle à notre modèle expliquant l'implication de Pontin et Reptin dans les processus liés à la chromatine, ces différents assemblages pourraient permettre de coordonner l'assemblage ou le désassemblage des protéines de la maturation des snoRNPs.

Références

- Abraham RT. "PI 3-kinase Related Kinases: 'Big' Players in Stress-induced Signaling Pathways.", *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):883-7. edition.
- Adam M, Robert F, Larochelle M, Gaudreau L. "H2A.Z Is Required for Global Chromatin Integrity and for Recruitment of RNA Polymerase II Under Specific Conditions.", *Mol Cell Biol*. 2001 Sep;21(18):6270-9. edition.
- Ai W, Zheng H, Yang X, Liu Y, Wang TC. "Tip60 Functions as a Potential Corepressor of KLF4 in Regulation of HDC Promoter Activity.", *Nucleic Acids Res*. 2007;35(18):6137-49. Epub 2007 Sep 7. edition.
- Albert I, Mavrich TN, Tomsho LP, Qi J, Zanton SJ, Schuster SC, Pugh BF. "Translational and Rotational Settings of H2A.Z Nucleosomes Across the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome.", *Nature*. 2007 Mar 29;446(7135):572-6. edition.
- ALLFREY VG, FAULKNER R, MIRSKY AE. "ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964 May;51:786-94. edition.
- Allmang C, Carbon P, Krol A. "The SBP2 and 15.5 kD/Snu13p Proteins Share the Same RNA Binding Domain: Identification of SBP2 Amino Acids Important to SECIS RNA Binding.", *RNA*. 2002 Oct;8(10):1308-18. edition.
- Altaf M, Auger A, Monnet-Saksouk J, Brodeur J, Piquet S, Cramet M, Bouchard N, Lacoste N, Utley RT, Gaudreau L, Côté J. "NuA4-dependent Acetylation of Nucleosomal Histones H4 and H2A Directly Stimulates Incorporation of H2A.Z by the SWR1 Complex.", *J Biol Chem*. 2010 May 21;285(21):15966-77. doi: 10.1074/jbc.M110.117069. Epub 2010 Mar 23. edition.
- Ammelburg M, Frickey T, Lupas AN. "Classification of AAA+ Proteins.", *J Struct Biol*. 2006 Oct;156(1):2-11. Epub 2006 May 26. edition.
- Angelov D, Vitolo JM, Mutskov V, Dimitrov S, Hayes JJ. "Preferential Interaction of the Core Histone Tail Domains with Linker DNA.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6599-604. Epub 2001 May 29. edition.
- Arcus V. "OB-fold Domains: a Snapshot of the Evolution of Sequence, Structure and Function.", *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Dec;12(6):794-801. edition.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. "The Nucleosomal Core Histone Octamer at 3.1 Å Resolution: a Tripartite Protein Assembly and a Left-handed Superhelix.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10148-52. edition.
- Arents G, Moudrianakis EN. "The Histone Fold: a Ubiquitous Architectural Motif Utilized in DNA Compaction and Protein Dimerization.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 21;92(24):11170-4. edition.
- Ausió J, Abbott DW. "The Many Tales of a Tail: Carboxyl-terminal Tail Heterogeneity Specializes Histone H2A Variants for Defined Chromatin Function.", *Biochemistry*. 2002 May 14;41(19):5945-9. edition.
- Babiarz JE, Halley JE, Rine J. "Telomeric Heterochromatin Boundaries Require NuA4-dependent Acetylation of Histone Variant H2A.Z in *Saccharomyces Cerevisiae*.", *Genes Dev*. 2006 Mar 15;20(6):700-10. edition.
- Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG. "Exchange of N-CoR Corepressor and Tip60 Coactivator Complexes Links Gene Expression by NF-kappaB and Beta-amyloid Precursor Protein.", *Cell*. 2002 Jul 12;110(1):55-67. edition.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. "Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain.", *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):120-4. edition.
- Bao Y, Shen X. "INO80 Subfamily of Chromatin Remodeling Complexes.", *Mutat Res*. 2007 May 1;618(1-2):18-29. Epub 2007 Jan 21. edition.

- Barbaric S, Luckenbach T, Schmid A, Blaschke D, Hörz W, Korber P. “Redundancy of Chromatin Remodeling Pathways for the Induction of the Yeast PHO5 Promoter in Vivo.”, *J Biol Chem*. 2007 Sep 21;282(38):27610-21. Epub 2007 Jul 13. edition.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. “High-resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome.”, *Cell*. 2007 May 18;129(4):823-37. edition.
- Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, Kemler R, Pradel J. “Pontin52 and Reptin52 Function as Antagonistic Regulators of Beta-catenin Signalling Activity.”, *EMBO J*. 2000 Nov 15;19(22):6121-30. edition.
- Bauer A, Huber O, Kemler R. “Pontin52, an Interaction Partner of Beta-catenin, Binds to the TATA Box Binding Protein.”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14787-92. edition.
- Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F. “Histone Methylation by the Drosophila Epigenetic Transcriptional Regulator Ash1.”, *Nature*. 2002 Oct 24;419(6909):857-62. Epub 2002 Oct 9. edition.
- Bellosta P, Hulf T, Balla Diop S, Usseglio F, Pradel J, Aragnol D, Gallant P. “Myc Interacts Genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to Control Growth and Proliferation During Drosophila Development.”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 16;102(33):11799-804. Epub 2005 Aug 8. edition.
- Bentley GA, Lewit-Bentley A, Finch JT, Podjarny AD, Roth M. “Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 16 Å Resolution.”, *J Mol Biol*. 1984 Jun 15;176(1):55-75. edition.
- Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, Groothuis TA, de Waard H, Wu J, Yuan L, Citterio E, Houtsmuller AB, Neefjes J, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, Dantuma NP. “DNA Damage Triggers Nucleotide Excision Repair-dependent Monoubiquitylation of Histone H2A.”, *Genes Dev*. 2006 May 15;20(10):1343-52. edition.
- Berk AJ. “Recent Lessons in Gene Expression, Cell Cycle Control, and Cell Biology from Adenovirus.”, *Oncogene*. 2005 Nov 21;24(52):7673-85. edition.
- Berkovich E, Ginsberg D. “ATM Is a Target for Positive Regulation by E2F-1.”, *Oncogene*. 2003 Jan 16;22(2):161-7. edition.
- Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, Grant PA, Smith MM, Christman MF. “Acetylation of Histone H4 by Esa1 Is Required for DNA Double-strand Break Repair.”, *Nature*. 2002 Sep 26;419(6905):411-5. edition.
- Biswas D, Takahata S, Stillman DJ. “Different Genetic Functions for the Rpd3(L) and Rpd3(S) Complexes Suggest Competition Between NuA4 and Rpd3(S).”, *Mol Cell Biol*. 2008 Jul;28(14):4445-58. doi: 10.1128/MCB.00164-08. Epub 2008 May 19. edition.
- Björklund M, Taipale M, Varjosalo M, Saharinen J, Lahdenperä J, Taipale J. “Identification of Pathways Regulating Cell Size and Cell-cycle Progression by RNAi.”, *Nature*. 2006 Feb 23;439(7079):1009-13. edition.
- Boudreault AA, Cronier D, Selleck W, Lacoste N, Utley RT, Allard S, Savard J, Lane WS, Tan S, Côté J. “Yeast Enhancer of Polycomb Defines Global Esa1-dependent Acetylation of Chromatin.”, *Genes Dev*. 2003 Jun 1;17(11):1415-28. edition.
- Boulard M, Bouvet P, Kundu TK, Dimitrov S. “Histone Variant Nucleosomes: Structure, Function and Implication in Disease.”, *Subcell Biochem*. 2007;41:71-89. edition.
- Boulon S, Bertrand E, Pradet-Balade B. “HSP90 and the R2TP Co-chaperone Complex: Building Multi-protein Machineries Essential for Cell Growth and Gene Expression.”, *RNA Biol*. 2012 Feb;9(2):148-54. doi: 10.4161/rna.18494. Epub 2012 Feb 1. edition.

- Boulon S, Marmier-Gourrier N, Pradet-Balade B, Wurth L, Verheggen C, Jádý BE, Rothé B, Pescia C, Robert MC, Kiss T, Bardoni B, Krol A, Branlant C, Allmang C, Bertrand E, Charpentier B. "The Hsp90 Chaperone Controls the Biogenesis of L7Ae RNPs through Conserved Machinery.", *J Cell Biol.* 2008 Feb 11;180(3):579-95. doi: 10.1083/jcb.200708110. edition.
- Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C, Molle D, Boireau S, Georgieva M, Azzag K, Robert MC, Ahmad Y, Neel H, Lamond AI, Bertrand E. "HSP90 and Its R2TP/Prefoldin-like Cochaperone Are Involved in the Cytoplasmic Assembly of RNA Polymerase II.", *Mol Cell.* 2010 Sep 24;39(6):912-24. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.023. edition.
- Brehm A, Tufteland KR, Aasland R, Becker PB. "The Many Colours of Chromodomains.", *Bioessays.* 2004 Feb;26(2):133-40. edition.
- Brickner DG, Cajigas I, Fondufe-Mittendorf Y, Ahmed S, Lee PC, Widom J, Brickner JH. "H2A.Z-mediated Localization of Genes at the Nuclear Periphery Confers Epigenetic Memory of Previous Transcriptional State.", *PLoS Biol.* 2007 Apr;5(4):e81. edition.
- Brickner JH. "Transcriptional Memory at the Nuclear Periphery.", *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Feb;21(1):127-33. doi: 10.1016/j.ceb.2009.01.007. Epub 2009 Jan 30. edition.
- Brower-Toland B, Wacker DA, Fulbright RM, Lis JT, Kraus WL, Wang MD. "Specific Contributions of Histone Tails and Their Acetylation to the Mechanical Stability of Nucleosomes.", *J Mol Biol.* 2005 Feb 11;346(1):135-46. Epub 2004 Dec 22. edition.
- Bruce K, Myers FA, Mantouvalou E, Lefevre P, Greaves I, Bonifer C, Tremethick DJ, Thorne AW, Crane-Robinson C. "The Replacement Histone H2A.Z in a Hyperacetylated Form Is a Feature of Active Genes in the Chicken.", *Nucleic Acids Res.* 2005 Oct 4;33(17):5633-9. Print 2005. edition.
- Cadigan KM. "TCFs and Wnt/ β -catenin Signaling: More Than One Way to Throw the Switch.", *Curr Top Dev Biol.* 2012;98:1-34. doi: 10.1016/B978-0-12-386499-4.00001-X. edition.
- Cai Y, Jin J, Florens L, Swanson SK, Kusch T, Li B, Workman JL, Washburn MP, Conaway RC, Conaway JW. "The Mammalian YL1 Protein Is a Shared Subunit of the TRRAP/TIP60 Histone Acetyltransferase and SRCAP Complexes.", *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13665-70. Epub 2005 Jan 11. edition.
- Cai Y, Jin J, Tomomori-Sato C, Sato S, Sorokina I, Parmely TJ, Conaway RC, Conaway JW. "Identification of New Subunits of the Multiprotein Mammalian TRRAP/TIP60-containing Histone Acetyltransferase Complex.", *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):42733-6. Epub 2003 Sep 8. edition.
- Cai Y, Jin J, Yao T, Gottschalk AJ, Swanson SK, Wu S, Shi Y, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW. "YY1 Functions with INO80 to Activate Transcription.", *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Sep;14(9):872-4. Epub 2007 Aug 26. edition.
- Campos EI, Reinberg D. "Histones: Annotating Chromatin.", *Annu Rev Genet.* 2009;43:559-99. doi: 10.1146/annurev.genet.032608.103928. edition.
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. "Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-group Silencing.", *Science.* 2002 Nov 1;298(5595):1039-43. Epub 2002 Sep 26. edition.
- Carlson ML, Wilson ET, Prescott SM. "Regulation of COX-2 Transcription in a Colon Cancer Cell Line by Pontin52/TIP49a.", *Mol Cancer.* 2003 Dec 15;2:42. edition.
- Cerosaletti K, Wright J, Concannon P. "Active Role for Nibrin in the Kinetics of Atm Activation.", *Mol Cell Biol.* 2006 Mar;26(5):1691-9. edition.
- Chailleux C, Tyteca S, Papin C, Boudsocq F, Puget N, Courilleau C, Grigoriev M, Canitrot Y, Trouche D. "Physical Interaction Between the Histone Acetyl Transferase Tip60 and

- the DNA Double-strand Breaks Sensor MRN Complex.”, *Biochem J.* 2010 Feb 24;426(3):365-71. doi: 10.1042/BJ20091329. edition.
- Charles GM, Chen C, Shih SC, Collins SR, Beltrao P, Zhang X, Sharma T, Tan S, Burlingame AL, Krogan NJ, Madhani HD, Narlikar GJ. “Site-specific Acetylation Mark on an Essential Chromatin-remodeling Complex Promotes Resistance to Replication Stress.”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 28;108(26):10620-5. doi: 10.1073/pnas.1019735108. Epub 2011 Jun 14. edition.
- Chauvet S, Usseglio F, Aragnol D, Pradel J. “Analysis of Paralogous Pontin and Reptin Gene Expression During Mouse Development.”, *Dev Genes Evol.* 2005 Nov;215(11):575-9. Epub 2005 Nov 4. edition.
- Chen CC, Carson JJ, Feser J, Tamburini B, Zabaronick S, Linger J, Tyler JK. “Acetylated Lysine 56 on Histone H3 Drives Chromatin Assembly after Repair and Signals for the Completion of Repair.”, *Cell.* 2008 Jul 25;134(2):231-43. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.035. edition.
- Chen L, Cai Y, Jin J, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Conaway JW, Conaway RC. “Subunit Organization of the Human INO80 Chromatin Remodeling Complex: An Evolutionarily Conserved Core Complex Catalyzes ATP-dependent Nucleosome Remodeling.”, *J Biol Chem.* 2011 Apr 1;286(13):11283-9. doi: 10.1074/jbc.M111.222505. Epub 2011 Feb 8. edition.
- Chen X, Cui D, Papusha A, Zhang X, Chu CD, Tang J, Chen K, Pan X, Ira G. “The Fun30 Nucleosome Remodeller Promotes Resection of DNA Double-strand Break Ends.”, *Nature.* 2012 Sep 27;489(7417):576-80. doi: 10.1038/nature11355. Epub 2012 Sep 9. edition.
- Chen Z, Yang H, Pavletich NP. “Mechanism of Homologous Recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA Structures.”, *Nature.* 2008 May 22;453(7194):489-4. doi: 10.1038/nature06971. edition.
- Cheung KL, Huen J, Houry WA, Ortega J. “Comparison of the Multiple Oligomeric Structures Observed for the Rvb1 and Rvb2 Proteins.”, *Biochem Cell Biol.* 2010 Feb;88(1):77-88. doi: 10.1139/o09-159. edition.
- Cheung KL, Huen J, Kakihara Y, Houry WA, Ortega J. “Alternative Oligomeric States of the Yeast Rvb1/Rvb2 Complex Induced by Histidine Tags.”, *J Mol Biol.* 2010 Dec 3;404(3):478-92. doi: 10.1016/j.jmb.2010.10.003. Epub 2010 Oct 8. edition.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. “Signaling to Chromatin through Histone Modifications.”, *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):263-71. edition.
- Cho SG, Bhoomik A, Broday L, Ivanov V, Rosenstein B, Ronai Z. “TIP49b, a Regulator of Activating Transcription Factor 2 Response to Stress and DNA Damage.”, *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(24):8398-413. edition.
- Choi J, Heo K, An W. “Cooperative Action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z Exchange Catalyzed by Acetylation of Nucleosomal H2A.”, *Nucleic Acids Res.* 2009 Oct;37(18):5993-6007. doi: 10.1093/nar/gkp660. Epub 2009 Aug 20. edition.
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. “gamma-H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-strand Break Repair.”, *Mol Cell.* 2005 Dec 9;20(5):801-9. Epub 2005 Nov 28. edition.
- Clapier CR, Cairns BR. “The Biology of Chromatin Remodeling Complexes.”, *Annu Rev Biochem.* 2009;78:273-304. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223. edition.
- Cloutier P, Coulombe B. “New Insights into the Biogenesis of Nuclear RNA Polymerases?””, *Biochem Cell Biol.* 2010 Apr;88(2):211-21. doi: 10.1139/o09-173. edition.

- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. "Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells.", *Science*. 2007 Mar 30;315(5820):1850-3. edition.
- Compton JL, Hancock R, Oudet P, Chambon P. "Biochemical and Electron-microscopic Evidence That the Subunit Structure of Chinese-hamster-ovary Interphase Chromatin Is Conserved in Mitotic Chromosomes.", *Eur J Biochem*. 1976 Nov 15;70(2):555-68. edition.
- Conaway RC, Conaway JW. "The INO80 Chromatin Remodeling Complex in Transcription, Replication and Repair.", *Trends Biochem Sci*. 2009 Feb;34(2):71-7. doi: 10.1016/j.tibs.2008.10.010. Epub 2008 Dec 6. edition.
- Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM. "A Novel RNA Binding Protein, SBP2, Is Required for the Translation of Mammalian Selenoprotein mRNAs.", *EMBO J*. 2000 Jan 17;19(2):306-14. edition.
- Costelloe T, Louge R, Tomimatsu N, Mukherjee B, Martini E, Khadaroo B, Dubois K, Wiegant WW, Thierry A, Burma S, van Attikum H, Llorente B. "The Yeast Fun30 and Human SMARCA4 Chromatin Remodellers Promote DNA End Resection.", *Nature*. 2012 Sep 27;489(7417):581-4. doi: 10.1038/nature11353. Epub 2012 Sep 9. edition.
- Courilleau C, Chailleux C, Jauneau A, Grimal F, Briois S, Boutet-Robinet E, Boudsocq F, Trouche D, Canitrot Y. "The Chromatin Remodeler P400 ATPase Facilitates Rad51-mediated Repair of DNA Double-strand Breaks.", *J Cell Biol*. 2012 Dec 24;199(7):1067-81. doi: 10.1083/jcb.201205059. edition.
- Couture JP, Nolet G, Beaulieu E, Blouin R, Gévry N. "The p400/Brd8 Chromatin Remodeling Complex Promotes Adipogenesis by Incorporating Histone Variant H2A.Z at PPAR γ Target Genes.", *Endocrinology*. 2012 Dec;153(12):5796-808. doi: 10.1210/en.2012-1380. Epub 2012 Oct 12. edition.
- Cuadrado A, Corrado N, Perdiguero E, Lafarga V, Muñoz-Canoves P, Nebreda AR. "Essential Role of p18Hamlet/SRCAP-mediated Histone H2A.Z Chromatin Incorporation in Muscle Differentiation.", *EMBO J*. 2010 Jun 16;29(12):2014-25. doi: 10.1038/emboj.2010.85. Epub 2010 May 14. edition.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T. "Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation.", *Cell*. 2004 Sep 3;118(5):545-53. edition.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. "Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity That Marks Chromosomal Polycomb Sites.", *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):185-96. edition.
- Dang CV. "MYC on the Path to Cancer.", *Cell*. 2012 Mar 30;149(1):22-35. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003. edition.
- Deal RB, Topp CN, McKinney EC, Meagher RB. "Repression of Flowering in Arabidopsis Requires Activation of FLOWERING LOCUS C Expression by the Histone Variant H2A.Z.", *Plant Cell*. 2007 Jan;19(1):74-83. Epub 2007 Jan 12. edition.
- Deaton AM, Bird A. "CpG Islands and the Regulation of Transcription.", *Genes Dev*. 2011 May 15;25(10):1010-22. doi: 10.1101/gad.203751.1. edition.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. "Structure and Ligand of a Histone Acetyltransferase Bromodomain.", *Nature*. 1999 Jun 3;399(6735):491-6. edition.
- Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Reina San Martin B, Van Laethem F, Yang YP, Petukhova GV, Eckhaus M, Feigenbaum L, Manova K, Kruhlak

- M, Camerini-Otero RD, Sharan S, Nussenzweig M, Nussenzweig A. "Role of Nbs1 in the Activation of the Atm Kinase Revealed in Humanized Mouse Models.", *Nat Cell Biol.* 2005 Jul;7(7):675-85. Epub 2005 Jun 19. edition.
- Diop SB, Bertaux K, Vasanthi D, Sarkeshik A, Goirand B, Aragnol D, Tolwinski NS, Cole MD, Pradel J, Yates JR 3rd, Mishra RK, Graba Y, Saurin AJ. "Reptin and Pontin Function Antagonistically with PcG and TrxG Complexes to Mediate Hox Gene Control.", *EMBO Rep.* 2008 Mar;9(3):260-6. doi: 10.1038/embor.2008.8. Epub 2008 Feb 8. edition.
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Côté J. "Binding of Chromatin-modifying Activities to Phosphorylated Histone H2A at DNA Damage Sites.", *Mol Cell.* 2004 Dec 22;16(6):979-90. edition.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. "A Role for *Saccharomyces Cerevisiae* Histone H2A in DNA Repair.", *Nature.* 2000 Dec 21-28;408(6815):1001-4. edition.
- Doyon Y, Côté J. "The Highly Conserved and Multifunctional NuA4 HAT Complex.", *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Apr;14(2):147-54. edition.
- Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Côté J. "Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans.", *Mol Cell Biol.* 2004 Mar;24(5):1884-96. edition.
- Ducat D, Kawaguchi S, Liu H, Yates JR 3rd, Zheng Y. "Regulation of Microtubule Assembly and Organization in Mitosis by the AAA+ ATPase Pontin.", *Mol Biol Cell.* 2008 Jul;19(7):3097-110. doi: 10.1091/mbc.E07-11-1202. Epub 2008 May 7. edition.
- Dugan KA, Wood MA, Cole MD. "TIP49, but Not TRRAP, Modulates c-Myc and E2F1 Dependent Apoptosis.", *Oncogene.* 2002 Aug 29;21(38):5835-43. edition.
- Durand-Dubief M, Will WR, Petrini E, Theodorou D, Harris RR, Crawford MR, Paszkiewicz K, Krueger F, Corraera RM, Vetter AT, Miller JR, Kent NA, Varga-Weisz P. "SWI/SNF-like Chromatin Remodeling Factor Fun30 Supports Point Centromere Function in *S. Cerevisiae*.", *PLoS Genet.* 2012 Sep;8(9):e1002974. doi: 10.1371/journal.pgen.1002974. Epub 2012 Sep 27. edition.
- Durant M, Pugh BF. "NuA4-directed Chromatin Transactions Throughout the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome.", *Mol Cell Biol.* 2007 Aug;27(15):5327-35. Epub 2007 May 25. edition.
- Ebbert R, Birkmann A, Schüller HJ. "The Product of the SNF2/SWI2 Parologue INO80 of *Saccharomyces Cerevisiae* Required for Efficient Expression of Various Yeast Structural Genes Is Part of a High-molecular-weight Protein Complex.", *Mol Microbiol.* 1999 May;32(4):741-51. edition.
- Elkaim J, Castroviejo M, Bennani D, Taouji S, Allain N, Laguerre M, Rosenbaum J, Dessolin J, Lestienne P. "First Identification of Small-molecule Inhibitors of Pontin by Combining Virtual Screening and Enzymatic Assay.", *Biochem J.* 2012 Apr 15;443(2):549-59. doi: 10.1042/BJ20111779. edition.
- Enemark EJ, Joshua-Tor L. "Mechanism of DNA Translocation in a Replicative Hexameric Helicase.", *Nature.* 2006 Jul 20;442(7100):270-5. edition.
- Erdel F, Rippe K. "Chromatin Remodelling in Mammalian Cells by ISWI-type Complexes--where, When and Why?", *FEBS J.* 2011 Oct;278(19):3608-18. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08282.x. Epub 2011 Sep 2. edition.
- Erzberger JP, Pirruccello MM, Berger JM. "The Structure of Bacterial DnaA: Implications for General Mechanisms Underlying DNA Replication Initiation.", *EMBO J.* 2002 Sep 16;21(18):4763-73. edition.

- Etard C, Gradl D, Kunz M, Eilers M, Wedlich D. "Pontin and Reptin Regulate Cell Proliferation in Early *Xenopus* Embryos in Collaboration with c-Myc and Miz-1.", *Mech Dev*. 2005 Apr;122(4):545-56. Epub 2005 Jan 22. edition.
- Euskirchen G, Auerbach RK, Snyder M. "SWI/SNF Chromatin-remodeling Factors: Multiscale Analyses and Diverse Functions.", *J Biol Chem*. 2012 Sep 7;287(37):30897-905. doi: 10.1074/jbc.R111.309302. Epub 2012 Sep 5. edition.
- Falbo KB, Alabert C, Katou Y, Wu S, Han J, Wehr T, Xiao J, He X, Zhang Z, Shi Y, Shirahige K, Pasero P, Shen X. "Involvement of a Chromatin Remodeling Complex in Damage Tolerance During DNA Replication.", *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Nov;16(11):1167-72. doi: 10.1038/nsmb.1686. Epub 2009 Oct 25. edition.
- Falck J, Coates J, Jackson SP. "Conserved Modes of Recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to Sites of DNA Damage.", *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):605-11. Epub 2005 Mar 2. edition.
- Fazio TG, Huff JT, Panning B. "An RNAi Screen of Chromatin Proteins Identifies Tip60-p400 as a Regulator of Embryonic Stem Cell Identity.", *Cell*. 2008 Jul 11;134(1):162-74. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.031. edition.
- Feng Y, Lee N, Fearon ER. "TIP49 Regulates Beta-catenin-mediated Neoplastic Transformation and T-cell Factor Target Gene Induction via Effects on Chromatin Remodeling.", *Cancer Res*. 2003 Dec 15;63(24):8726-34. edition.
- Fielding AB, Dobrev I, McDonald PC, Foster LJ, Dedhar S. "Integrin-linked Kinase Localizes to the Centrosome and Regulates Mitotic Spindle Organization.", *J Cell Biol*. 2008 Feb 25;180(4):681-9. doi: 10.1083/jcb.200710074. Epub 2008 Feb 18. edition.
- Filipowicz W, Pogacić V. "Biogenesis of Small Nucleolar Ribonucleoproteins.", *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Jun;14(3):319-27. edition.
- Finch JT, Brown RS, Richmond T, Rushton B, Lutter LC, Klug A. "X-ray Diffraction Study of a New Crystal Form of the Nucleosome Core Showing Higher Resolution.", *J Mol Biol*. 1981 Feb 5;145(4):757-69. edition.
- Finn K, Lowndes NF, Grenon M. "Eukaryotic DNA Damage Checkpoint Activation in Response to Double-strand Breaks.", *Cell Mol Life Sci*. 2012 May;69(9):1447-73. doi: 10.1007/s00018-011-0875-3. Epub 2011 Nov 15. edition.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. "Histone and Chromatin Cross-talk.", *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):172-83. edition.
- Flaus A, Martin DM, Barton GJ, Owen-Hughes T. "Identification of Multiple Distinct Snf2 Subfamilies with Conserved Structural Motifs.", *Nucleic Acids Res*. 2006 May 31;34(10):2887-905. Print 2006. edition.
- Ford J, Odeyale O, Eskandar A, Kouba N, Shen CH. "A SWI/SNF- and INO80-dependent Nucleosome Movement at the INO1 Promoter.", *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 5;361(4):974-9. Epub 2007 Jul 30. edition.
- Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE. "Stable Association of Hsp90 and P23, but Not Hsp70, with Active Human Telomerase.", *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):15571-4. Epub 2001 Mar 23. edition.
- Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B. "MYC Recruits the TIP60 Histone Acetyltransferase Complex to Chromatin.", *EMBO Rep*. 2003 Jun;4(6):575-80. edition.
- Fritsch, Olivier; Benvenuto, Giovanna; Bowler, Chris; Molinier, Jean; Hohn, Barbara. "The INO80 Protein Controls Homologous Recombination in *Arabidopsis Thaliana*.", *Molecular Cell*. Nov2004, Vol. 16 Issue 3, p479-485. edition.

- Fu Y, Sinha M, Peterson CL, Weng Z. "The Insulator Binding Protein CTCF Positions 20 Nucleosomes Around Its Binding Sites Across the Human Genome.", *PLoS Genet.* 2008 Jul 25;4(7):e1000138. doi: 10.1371/journal.pgen.1000138. edition.
- Fuchs M, Gerber J, Drapkin R, Sif S, Ikura T, Ogryzko V, Lane WS, Nakatani Y, Livingston DM. "The P400 Complex Is an Essential E1A Transformation Target.", *Cell.* 2001 Aug 10;106(3):297-307. edition.
- Gai D, Zhao R, Li D, Finkielstein CV, Chen XS. "Mechanisms of Conformational Change for a Replicative Hexameric Helicase of SV40 Large Tumor Antigen.", *Cell.* 2004 Oct 1;119(1):47-60. edition.
- Galarneau L, Nourani A, Boudreault AA, Zhang Y, Héliot L, Allard S, Savard J, Lane WS, Stillman DJ, Côté J. "Multiple Links Between the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex and Epigenetic Control of Transcription.", *Mol Cell.* 2000 Jun;5(6):927-37. edition.
- Gartner W, Rossbacher J, Zierhut B, Daneva T, Base W, Weissel M, Waldhäusl W, Pasternack MS, Wagner L. "The ATP-dependent Helicase RUVBL1/TIP49a Associates with Tubulin During Mitosis.", *Cell Motil Cytoskeleton.* 2003 Oct;56(2):79-93. edition.
- Gaughan L, Brady ME, Cook S, Neal DE, Robson CN. "Tip60 Is a Co-activator Specific for Class I Nuclear Hormone Receptors.", *J Biol Chem.* 2001 Dec 14;276(50):46841-8. Epub 2001 Oct 8. edition.
- Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN. "Tip60 and Histone Deacetylase 1 Regulate Androgen Receptor Activity through Changes to the Acetylation Status of the Receptor.", *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):25904-13. Epub 2002 May 6. edition.
- Geng F, Laurent BC. "Roles of SWI/SNF and HATs Throughout the Dynamic Transcription of a Yeast Glucose-repressible Gene.", *EMBO J.* 2004 Jan 14;23(1):127-37. Epub 2003 Dec 18. edition.
- Genovese G, Ghosh P, Li H, Rettino A, Sioletic S, Cittadini A, Sgambato A. "The Tumor Suppressor HINT1 Regulates MITF and B-catenin Transcriptional Activity in Melanoma Cells.", *Cell Cycle.* 2012 Jun 1;11(11):2206-15. doi: 10.4161/cc.20765. Epub 2012 Jun 1. edition.
- Gévry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L. "P21 Transcription Is Regulated by Differential Localization of Histone H2A.Z.", *Genes Dev.* 2007 Aug 1;21(15):1869-81. edition.
- Gévry N, Hardy S, Jacques PE, Laflamme L, Sotelis A, Robert F, Gaudreau L. "Histone H2A.Z Is Essential for Estrogen Receptor Signaling.", *Genes Dev.* 2009 Jul 1;23(13):1522-33. doi: 10.1101/gad.1787109. Epub 2009 Jun 10. edition.
- Ginsburg DS, Govind CK, Hinnebusch AG. "NuA4 Lysine Acetyltransferase Esa1 Is Targeted to Coding Regions and Stimulates Transcription Elongation with Gcn5.", *Mol Cell Biol.* 2009 Dec;29(24):6473-87. doi: 10.1128/MCB.01033-09. Epub 2009 Oct 12. edition.
- Gligoris T, Thireos G, Tzamarias D. "The Tup1 Corepressor Directs Htz1 Deposition at a Specific Promoter Nucleosome Marking the GAL1 Gene for Rapid Activation.", *Mol Cell Biol.* 2007 Jun;27(11):4198-205. Epub 2007 Mar 26. edition.
- Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, Cox J, Barton GJ, Mann M, Hay RT. "System-wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock.", *Sci Signal.* 2009 May 26;2(72):ra24. doi: 10.1126/scisignal.2000282. edition.

- Gonzales FA, Zanchin NI, Luz JS, Oliveira CC. "Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* Nop17p, a Novel Nop58p-interacting Protein That Is Involved in Pre-rRNA Processing.", *J Mol Biol.* 2005 Feb 18;346(2):437-55. Epub 2004 Dec 21. edition.
- Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, McVey CE, Vonnrhein C, Round A, Svergun DI, Donner P, Matias PM, Carrondo MA. "Structural and Functional Insights into a Dodecameric Molecular Machine - the RuvBL1/RuvBL2 Complex.", *J Struct Biol.* 2011 Dec;176(3):279-91. doi: 10.1016/j.jsb.2011.09.001. Epub 2011 Sep 10. edition.
- Gospodinov A, Tsaneva I, Anachkova B. "RAD51 Foci Formation in Response to DNA Damage Is Modulated by TIP49.", *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Apr;41(4):925-33. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.004. Epub 2008 Sep 13. edition.
- Gospodinov A, Vaissiere T, Krastev DB, Legube G, Anachkova B, Herceg Z. "Mammalian Ino80 Mediates Double-strand Break Repair through Its Role in DNA End Strand Resection.", *Mol Cell Biol.* 2011 Dec;31(23):4735-45. doi: 10.1128/MCB.06182-11. Epub 2011 Sep 26. edition.
- Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M. "Identification of a Novel Phosphorylation Site on Histone H3 Coupled with Mitotic Chromosome Condensation.", *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25543-9. edition.
- Gozdecka M, Breitwieser W. "The Roles of ATF2 (activating Transcription Factor 2) in Tumorigenesis.", *Biochem Soc Trans.* 2012 Feb;40(1):230-4. doi: 10.1042/BST20110630. edition.
- Grant PA. "A Tale of Histone Modifications.", *Genome Biol.* 2001;2(4):REVIEWS0003. Epub 2001 Apr 5. edition.
- Gribun A, Cheung KL, Huen J, Ortega J, Houry WA. "Yeast Rvb1 and Rvb2 Are ATP-dependent DNA Helicases That Form a Heterohexameric Complex.", *J Mol Biol.* 2008 Mar 7;376(5):1320-33. doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.049. Epub 2008 Jan 3. edition.
- Grigoletto A, Lestienne P, Rosenbaum J. "The Multifaceted Proteins Reptin and Pontin as Major Players in Cancer.", *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr;1815(2):147-57. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.11.002. Epub 2010 Nov 25. edition.
- Grigoriev M, Hsieh P. "A Histone Octamer Blocks Branch Migration of a Holliday Junction.", *Mol Cell Biol.* 1997 Dec;17(12):7139-50. edition.
- Gu W, Roeder RG. "Activation of P53 Sequence-specific DNA Binding by Acetylation of the P53 C-terminal Domain.", *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):595-606. edition.
- Guillemette B, Bataille AR, Gévry N, Adam M, Blanchette M, Robert F, Gaudreau L. "Variant Histone H2A.Z Is Globally Localized to the Promoters of Inactive Yeast Genes and Regulates Nucleosome Positioning.", *PLoS Biol.* 2005 Dec;3(12):e384. Epub 2005 Nov 1. edition.
- Gupta A, Jha S, Engel DA, Ornelles DA, Dutta A. "Tip60 Degradation by Adenovirus Relieves Transcriptional Repression of Viral Transcriptional Activator E1A.", *Oncogene.* 2012 Nov 26. doi: 10.1038/onc.2012.534. edition.
- Haber JE. "Lucky Breaks: Analysis of Recombination in *Saccharomyces*.", *Mutat Res.* 2000 Jun 30;451(1-2):53-69. edition.
- Halley JE, Kaplan T, Wang AY, Kobor MS, Rine J. "Roles for H2A.Z and Its Acetylation in GAL1 Transcription and Gene Induction, but Not GAL1-transcriptional Memory.", *PLoS Biol.* 2010 Jun 22;8(6):e1000401. doi: 10.1371/journal.pbio.1000401. edition.
- Hardy S, Jacques PE, Gévry N, Forest A, Fortin ME, Laflamme L, Gaudreau L, Robert F. "The Euchromatic and Heterochromatic Landscapes Are Shaped by Antagonizing

- Effects of Transcription on H2A.Z Deposition.”, *PLoS Genet.* 2009 Oct;5(10):e1000687. doi: 10.1371/journal.pgen.1000687. Epub 2009 Oct 16. edition.
- Harp JM, Hanson BL, Timm DE, Bunick GJ. “Asymmetries in the Nucleosome Core Particle at 2.5 Å Resolution.”, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2000 Dec;56(Pt 12):1513-34. edition.
- Harrison JC, Haber JE. “Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint.”, *Annu Rev Genet.* 2006;40:209-35. edition.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. “Nuclear ADP-ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where Are We Today and Where Are We Going?”, *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006 Sep;70(3):789-829. edition.
- Haurie V, Ménard L, Nicou A, Touriol C, Metzler P, Fernandez J, Taras D, Lestienne P, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Prats H, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. “Adenosine Triphosphatase Pontin Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma and Coregulated with Reptin through a New Posttranslational Mechanism.”, *Hepatology.* 2009 Dec;50(6):1871-83. doi: 10.1002/hep.23215. edition.
- Heo K, Kim H, Choi SH, Choi J, Kim K, Gu J, Lieber MR, Yang AS, An W. “FACT-mediated Exchange of Histone Variant H2AX Regulated by Phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16.”, *Mol Cell.* 2008 Apr 11;30(1):86-97. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.029. edition.
- Holt BF 3rd, Boyes DC, Ellerström M, Siefers N, Wiig A, Kauffman S, Grant MR, Dangel JL. “An Evolutionarily Conserved Mediator of Plant Disease Resistance Gene Function Is Required for Normal Arabidopsis Development.”, *Dev Cell.* 2002 Jun;2(6):807-17. edition.
- Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA. “Functional Requirement of P23 and Hsp90 in Telomerase Complexes.”, *Genes Dev.* 1999 Apr 1;13(7):817-26. edition.
- Horejsí Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. “Distinct Functional Domains of Nbs1 Modulate the Timing and Magnitude of ATM Activation after Low Doses of Ionizing Radiation.”, *Oncogene.* 2004 Apr 15;23(17):3122-7. edition.
- Horejsí Z, Takai H, Adelman CA, Collis SJ, Flynn H, Maslen S, Skehel JM, de Lange T, Boulton SJ. “CK2 Phospho-dependent Binding of R2TP Complex to TEL2 Is Essential for mTOR and SMG1 Stability.”, *Mol Cell.* 2010 Sep 24;39(6):839-50. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.037. edition.
- Horn PJ, Peterson CL. “Molecular Biology. Chromatin Higher Order Folding--wrapping up Transcription.”, *Science.* 2002 Sep 13;297(5588):1824-7. edition.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD. “Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Is Governed by Ipl1/aurora Kinase and Glc7/PP1 Phosphatase in Budding Yeast and Nematodes.”, *Cell.* 2000 Aug 4;102(3):279-91. edition.
- Huen J, Kakihara Y, Ugwu F, Cheung KL, Ortega J, Houry WA. “Rvb1-Rvb2: Essential ATP-dependent Helicases for Critical Complexes.”, *Biochem Cell Biol.* 2010 Feb;88(1):29-40. doi: 10.1139/o09-122. edition.
- Hyland EM, Cosgrove MS, Molina H, Wang D, Pandey A, Cottee RJ, Boeke JD. “Insights into the Role of Histone H3 and Histone H4 Core Modifiable Residues in *Saccharomyces Cerevisiae*.”, *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(22):10060-70. edition.
- Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, Smith MM. “Regulation of Replication Licensing by Acetyltransferase Hbo1.”, *Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(3):1098-108. edition.
- Iizuka M, Smith MM. “Functional Consequences of Histone Modifications.”, *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Apr;13(2):154-60. edition.

- Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y. "Involvement of the TIP60 Histone Acetylase Complex in DNA Repair and Apoptosis.", *Cell*. 2000 Aug 18;102(4):463-73. edition.
- Ikura T, Tashiro S, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K. "DNA Damage-dependent Acetylation and Ubiquitination of H2AX Enhances Chromatin Dynamics.", *Mol Cell Biol*. 2007 Oct;27(20):7028-40. Epub 2007 Aug 20. edition.
- Ishibashi T, Dryhurst D, Rose KL, Shabanowitz J, Hunt DF, Ausió J. "Acetylation of Vertebrate H2A.Z and Its Effect on the Structure of the Nucleosome.", *Biochemistry*. 2009 Jun 9;48(22):5007-17. doi: 10.1021/bi900196c. edition.
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. "Evolutionary History and Higher Order Classification of AAA+ ATPases.", *J Struct Biol*. 2004 Apr-May;146(1-2):11-31. edition.
- Izumi N, Yamashita A, Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, Hirano H, Anderson P, Ohno S. "AAA+ Proteins RUVBL1 and RUVBL2 Coordinate PIKK Activity and Function in Nonsense-mediated mRNA Decay.", *Sci Signal*. 2010 Apr 6;3(116):ra27. doi: 10.1126/scisignal.2000468. edition.
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S. "Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-methylated Histone H3 Tail.", *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2080-3. Epub 2002 Feb 21. edition.
- Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, Thérien C, Bergeron D, Bourassa S, Greenblatt J, Chabot B, Poirier GG, Hughes TR, Blanchette M, Price DH, Coulombe B. "Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme.", *Mol Cell*. 2007 Jul 20;27(2):262-74. edition.
- Jha S, Gupta A, Dar A, Dutta A. "RVBs Are Required for Assembling a Functional TIP60 Complex.", *Mol Cell Biol*. 2013 Mar;33(6):1164-74. doi: 10.1128/MCB.01567-12. Epub 2013 Jan 7. edition.
- Jha S, Shibata E, Dutta A. "Human Rvb1/Tip49 Is Required for the Histone Acetyltransferase Activity of Tip60/NuA4 and for the Downregulation of Phosphorylation on H2AX after DNA Damage.", *Mol Cell Biol*. 2008 Apr;28(8):2690-700. doi: 10.1128/MCB.01983-07. Epub 2008 Feb 19. edition.
- Jha S, Vande Pol S, Banerjee NS, Dutta AB, Chow LT, Dutta A. "Destabilization of TIP60 by Human Papillomavirus E6 Results in Attenuation of TIP60-dependent Transcriptional Regulation and Apoptotic Pathway.", *Mol Cell*. 2010 Jun 11;38(5):700-11. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.020. edition.
- Jiang C, Pugh BF. "Nucleosome Positioning and Gene Regulation: Advances through Genomics.", *Nat Rev Genet*. 2009 Mar;10(3):161-72. doi: 10.1038/nrg2522. edition.
- Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD. "The FATC Domains of PIKK Proteins Are Functionally Equivalent and Participate in the Tip60-dependent Activation of DNA-PKcs and ATM.", *J Biol Chem*. 2006 Jun 9;281(23):15741-6. Epub 2006 Apr 9. edition.
- Jin J, Cai Y, Yao T, Gottschalk AJ, Florens L, Swanson SK, Gutiérrez JL, Coleman MK, Workman JL, Mushegian A, Washburn MP, Conaway RC, Conaway JW. "A Mammalian Chromatin Remodeling Complex with Similarities to the Yeast INO80 Complex.", *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41207-12. Epub 2005 Oct 17. edition.
- Johnson PF. "Molecular Stop Signs: Regulation of Cell-cycle Arrest by C/EBP Transcription Factors.", *J Cell Sci*. 2005 Jun 15;118(Pt 12):2545-55. edition.

- Jónsson ZO, Dhar SK, Narlikar GJ, Auty R, Wagle N, Pellman D, Pratt RE, Kingston R, Dutta A. "Rvb1p and Rvb2p Are Essential Components of a Chromatin Remodeling Complex That Regulates Transcription of over 5% of Yeast Genes.", *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16279-88. Epub 2001 Feb 5. edition.
- Jónsson ZO, Jha S, Wohlschlegel JA, Dutta A. "Rvb1p/Rvb2p Recruit Arp5p and Assemble a Functional Ino80 Chromatin Remodeling Complex.", *Mol Cell*. 2004 Nov 5;16(3):465-77. edition.
- Kaidi A, Jackson SP. "KAT5 Tyrosine Phosphorylation Couples Chromatin Sensing to ATM Signalling.", *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):70-4. doi: 10.1038/nature12201. Epub 2013 May 26. edition.
- Kalocsay M, Hiller NJ, Jentsch S. "Chromosome-wide Rad51 Spreading and SUMO-H2A.Z-dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-strand Break.", *Mol Cell*. 2009 Feb 13;33(3):335-43. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.016. edition.
- Kamakaka RT, Biggins S. "Histone Variants: Deviants?", *Genes Dev*. 2005 Feb 1;19(3):295-310. edition.
- Kanemaki M, Kurokawa Y, Matsu-ura T, Makino Y, Masani A, Okazaki K, Morishita T, Tamura TA. "TIP49b, a New RuvB-like DNA Helicase, Is Included in a Complex Together with Another RuvB-like DNA Helicase, TIP49a.", *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22437-44. edition.
- Kanemaki M, Makino Y, Yoshida T, Kishimoto T, Koga A, Yamamoto K, Yamamoto M, Moncollin V, Egly JM, Muramatsu M, Tamura T. "Molecular Cloning of a Rat 49-kDa TBP-Interacting Protein (TIP49) That Is Highly Homologous to the Bacterial RuvB", *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 9;235(1):64-8. edition.
- Kashiwaba S, Kitahashi K, Watanabe T, Onoda F, Ohtsu M, Murakami Y. "The Mammalian INO80 Complex Is Recruited to DNA Damage Sites in an ARP8 Dependent Manner.", *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Nov 26;402(4):619-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.066. Epub 2010 Oct 28. edition.
- Kawashima S, Ogiwara H, Tada S, Harata M, Wintersberger U, Enomoto T, Seki M. "The INO80 Complex Is Required for Damage-induced Recombination.", *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 13;355(3):835-41. Epub 2007 Feb 15. edition.
- Kelly TK, Miranda TB, Liang G, Berman BP, Lin JC, Tanay A, Jones PA. "H2A.Z Maintenance During Mitosis Reveals Nucleosome Shifting on Mitotically Silenced Genes.", *Mol Cell*. 2010 Sep 24;39(6):901-11. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.026. edition.
- Kent NA, Chambers AL, Downs JA. "Dual Chromatin Remodeling Roles for RSC During DNA Double Strand Break Induction and Repair at the Yeast MAT Locus.", *J Biol Chem*. 2007 Sep 21;282(38):27693-701. Epub 2007 Jul 25. edition.
- Keogh MC, Mennella TA, Sawa C, Berthelet S, Krogan NJ, Wolek A, Podolny V, Carpenter LR, Greenblatt JF, Baetz K, Buratowski S. "The *Saccharomyces Cerevisiae* Histone H2A Variant Htz1 Is Acetylated by NuA4.", *Genes Dev*. 2006 Mar 15;20(6):660-5. edition.
- Khorasanizadeh S. "The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation.", *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259-72. edition.
- Kim JH, Choi HJ, Kim B, Kim MH, Lee JM, Kim IS, Lee MH, Choi SJ, Kim KI, Kim SI, Chung CH, Baek SH. "Roles of Sumoylation of a Reptin Chromatin-remodelling Complex in Cancer Metastasis.", *Nat Cell Biol*. 2006 Jun;8(6):631-9. Epub 2006 May 14. edition.

- Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, Sawyers CL, Rosenfeld MG, Baek SH. "Transcriptional Regulation of a Metastasis Suppressor Gene by Tip60 and Beta-catenin Complexes.", *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):921-6. edition.
- Kim JH, Lee JM, Nam HJ, Choi HJ, Yang JW, Lee JS, Kim MH, Kim SI, Chung CH, Kim KI, Baek SH. "SUMOylation of Pontin Chromatin-remodeling Complex Reveals a Signal Integration Code in Prostate Cancer Cells.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 26;104(52):20793-8. Epub 2007 Dec 17. edition.
- Kim JH, Park SM, Kang MR, Oh SY, Lee TH, Muller MT, Chung IK. "Ubiquitin Ligase MKRN1 Modulates Telomere Length Homeostasis through a Proteolysis of hTERT.", *Genes Dev*. 2005 Apr 1;19(7):776-81. edition.
- Kim SG, Hoffman GR, Poulogiannis G, Buel GR, Jang YJ, Lee KW, Kim BY, Erikson RL, Cantley LC, Choo AY, Blenis J. "Metabolic Stress Controls mTORC1 Lysosomal Localization and Dimerization by Regulating the TTT-RUVBL1/2 Complex.", *Mol Cell*. 2013 Jan 10;49(1):172-85. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.003. Epub 2012 Nov 8. edition.
- Kim ST, Xu B, Kastan MB. "Involvement of the Cohesin Protein, Smc1, in Atm-dependent and Independent Responses to DNA Damage.", *Genes Dev*. 2002 Mar 1;16(5):560-70. edition.
- King TH, Decatur WA, Bertrand E, Maxwell ES, Fournier MJ. "A Well-connected and Conserved Nucleoplasmic Helicase Is Required for Production of Box C/D and H/ACA snoRNAs and Localization of snoRNP Proteins.", *Mol Cell Biol*. 2001 Nov;21(22):7731-46. edition.
- Kiss T, Fayet E, Jády BE, Richard P, Weber M. "Biogenesis and Intranuclear Trafficking of Human Box C/D and H/ACA RNPs.", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:407-17. edition.
- Kiss T, Fayet-Lebaron E, Jády BE. "Box H/ACA Small Ribonucleoproteins.", *Mol Cell*. 2010 Mar 12;37(5):597-606. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.032. edition.
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. "Phosphorylation of SMC1 Is a Critical Downstream Event in the ATM-NBS1-BRCA1 Pathway.", *Genes Dev*. 2004 Jun 15;18(12):1423-38. Epub 2004 Jun 2. edition.
- Kitayama K, Kamo M, Oma Y, Matsuda R, Uchida T, Ikura T, Tashiro S, Ohyama T, Winsor B, Harata M. "The Human Actin-related Protein hArp5: Nucleo-cytoplasmic Shuttling and Involvement in DNA Repair.", *Exp Cell Res*. 2009 Jan 15;315(2):206-17. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.028. Epub 2008 Nov 5. edition.
- Klymenko T, Papp B, Fischle W, Köcher T, Schelder M, Fritsch C, Wild B, Wilm M, Müller J. "A Polycomb Group Protein Complex with Sequence-specific DNA-binding and Selective Methyl-lysine-binding Activities.", *Genes Dev*. 2006 May 1;20(9):1110-22. Epub 2006 Apr 17. edition.
- Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J. "A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin.", *PLoS Biol*. 2004 May;2(5):E131. Epub 2004 Mar 23. edition.
- Koch HB, Zhang R, Verdoodt B, Bailey A, Zhang CD, Yates JR 3rd, Menssen A, Hermeking H. "Large-scale Identification of c-MYC-associated Proteins Using a Combined TAP/MudPIT Approach.", *Cell Cycle*. 2007 Jan 15;6(2):205-17. Epub 2007 Jan 20. edition.

- Kolligs FT, Hu G, Dang CV, Fearon ER. "Neoplastic Transformation of RK3E by Mutant Beta-catenin Requires Dereglulation of Tcf/Lef Transcription but Not Activation of C-myc Expression.", *Mol Cell Biol*. 1999 Aug;19(8):5696-706. edition.
- Kouzarides T. "Chromatin Modifications and Their Function.", *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705. edition.
- Kouzarides T. "Histone Methylation in Transcriptional Control.", *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Apr;12(2):198-209. edition.
- Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H, Haw RA, Pootoolal J, Tong A, Canadien V, Richards DP, Wu X, Emili A, Hughes TR, Buratowski S, Greenblatt JF. "A Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1.", *Mol Cell*. 2003 Dec;12(6):1565-76. edition.
- Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller WG, McNally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A. "Changes in Chromatin Structure and Mobility in Living Cells at Sites of DNA Double-strand Breaks.", *J Cell Biol*. 2006 Mar 13;172(6):823-34. Epub 2006 Mar 6. edition.
- Kumar SV, Wigge PA. "H2A.Z-containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis.", *Cell*. 2010 Jan 8;140(1):136-47. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.006. edition.
- Kundu S, Peterson CL. "Dominant Role for Signal Transduction in the Transcriptional Memory of Yeast GAL Genes.", *Mol Cell Biol*. 2010 May;30(10):2330-40. doi: 10.1128/MCB.01675-09. Epub 2010 Mar 8. edition.
- Kurdistan SK, Grunstein M. "Histone Acetylation and Deacetylation in Yeast.", *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Apr;4(4):276-84. edition.
- Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR 3rd, Abmayr SM, Washburn MP, Workman JL. "Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions.", *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2084-7. Epub 2004 Nov 4. edition.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. "Methylation of Histone H3 Lysine 9 Creates a Binding Site for HP1 Proteins.", *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):116-20. edition.
- Längst G, Becker PB. "Nucleosome Remodeling: One Mechanism, Many Phenomena?", *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 15;1677(1-3):58-63. edition.
- Latham JA, Dent SY. "Cross-regulation of Histone Modifications.", *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Nov;14(11):1017-24. Epub 2007 Nov 5. edition.
- Lauscher JC, Loddenkemper C, Kosel L, Gröne J, Buhr HJ, Huber O. "Increased Pontin Expression in Human Colorectal Cancer Tissue.", *Hum Pathol*. 2007 Jul;38(7):978-85. Epub 2007 Apr 18. edition.
- Lavin MF, Kozlov S. "ATM Activation and DNA Damage Response.", *Cell Cycle*. 2007 Apr 15;6(8):931-42. Epub 2007 Apr 20. edition.
- Lee JS, Kim Y, Bhin J, Shin HJ, Nam HJ, Lee SH, Yoon JB, Binda O, Gozani O, Hwang D, Baek SH. "Hypoxia-induced Methylation of a Pontin Chromatin Remodeling Factor.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 16;108(33):13510-5. doi: 10.1073/pnas.1106106108. Epub 2011 Aug 8. edition.
- Lee JS, Kim Y, Kim IS, Kim B, Choi HJ, Lee JM, Shin HJ, Kim JH, Kim JY, Seo SB, Lee H, Binda O, Gozani O, Semenza GL, Kim M, Kim KI, Hwang D, Baek SH. "Negative Regulation of Hypoxic Responses via Induced Reptin Methylation.", *Mol Cell*. 2010 Jul 9;39(1):71-85. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.008. edition.
- Lee JY, Yang W. "UvrD Helicase Unwinds DNA One Base Pair at a Time by a Two-part Power Stroke.", *Cell*. 2006 Dec 29;127(7):1349-60. edition.

- Lee MS, Seo J, Choi DY, Lee EW, Ko A, Ha NC, Yoon JB, Lee HW, Kim KP, Song J. “Stabilization of P21 (Cip1/WAF1) Following Tip60-dependent Acetylation Is Required for P21-mediated DNA Damage Response.”, *Cell Death Differ.* 2013 Apr;20(4):620-9. doi: 10.1038/cdd.2012.159. Epub 2012 Dec 14. edition.
- Legube G, Linares LK, Tyteca S, Caron C, Scheffner M, Chevillard-Briet M, Trouche D. “Role of the Histone Acetyl Transferase Tip60 in the P53 Pathway.”, *J Biol Chem.* 2004 Oct 22;279(43):44825-33. Epub 2004 Aug 13. edition.
- Lemieux K, Larochelle M, Gaudreau L. “Variant Histone H2A.Z, but Not the HMG Proteins Nhp6a/b, Is Essential for the Recruitment of Swi/Snf, Mediator, and SAGA to the Yeast GAL1 UAS(G).”, *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 16;369(4):1103-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.144. Epub 2008 Mar 10. edition.
- Lenzen CU, Steinmann D, Whiteheart SW, Weis WI. “Crystal Structure of the Hexamerization Domain of N-ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein.”, *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):525-36. edition.
- Li B, Carey M, Workman JL. “The Role of Chromatin During Transcription.”, *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):707-19. edition.
- Li B, Pattenden SG, Lee D, Gutiérrez J, Chen J, Seidel C, Gerton J, Workman JL. “Preferential Occupancy of Histone Variant H2AZ at Inactive Promoters Influences Local Histone Modifications and Chromatin Remodeling.”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 20;102(51):18385-90. Epub 2005 Dec 12. edition.
- Li D, Zhao R, Lilyestrom W, Gai D, Zhang R, DeCaprio JA, Fanning E, Jochimiak A, Szakonyi G, Chen XS. “Structure of the Replicative Helicase of the Oncoprotein SV40 Large Tumour Antigen.”, *Nature.* 2003 May 29;423(6939):512-8. edition.
- Li H, Zhang Y, Su T, Santella RM, Weinstein IB. “Hint1 Is a Haplo-insufficient Tumor Suppressor in Mice.”, *Oncogene.* 2006 Feb 2;25(5):713-21. edition.
- Li W, Zeng J, Li Q, Zhao L, Liu T, Björkholm M, Jia J, Xu D. “Reptin Is Required for the Transcription of Telomerase Reverse Transcriptase and Over-expressed in Gastric Cancer.”, *Mol Cancer.* 2010 May 30;9:132. doi: 10.1186/1476-4598-9-132. edition.
- Liang B, Qiu J, Ratnakumar K, Laurent BC. “RSC Functions as an Early Double-strand-break Sensor in the Cell’s Response to DNA Damage.”, *Curr Biol.* 2007 Aug 21;17(16):1432-7. Epub 2007 Aug 9. edition.
- Lieber MR. “The Mechanism of Double-strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-joining Pathway.”, *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181-211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131. edition.
- Light WH, Brickner DG, Brand VR, Brickner JH. “Interaction of a DNA Zip Code with the Nuclear Pore Complex Promotes H2A.Z Incorporation and INO1 Transcriptional Memory.”, *Mol Cell.* 2010 Oct 8;40(1):112-25. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.007. edition.
- Lim CR, Kimata Y, Ohdate H, Kokubo T, Kikuchi N, Horigome T, Kohno K. “The *Saccharomyces Cerevisiae* RuvB-like Protein, Tih2p, Is Required for Cell Cycle Progression and RNA Polymerase II-directed Transcription.”, *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22409-17. edition.
- Longhese MP, Bonetti D, Manfrini N, Clerici M. “Mechanisms and Regulation of DNA End Resection.”, *EMBO J.* 2010 Sep 1;29(17):2864-74. doi: 10.1038/emboj.2010.165. Epub 2010 Jul 20. edition.
- López-Perrote A, Muñoz-Hernández H, Gil D, Llorca O. “Conformational Transitions Regulate the Exposure of a DNA-binding Domain in the RuvBL1-RuvBL2 Complex.”, *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov;40(21):11086-99. doi: 10.1093/nar/gks871. Epub 2012 Sep 21. edition.

- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. "Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution.", *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):251-60. edition.
- Machado-Pinilla R, Liger D, Leulliot N, Meier UT. "Mechanism of the AAA+ ATPases Pontin and Reptin in the Biogenesis of H/ACA RNPs.", *RNA*. 2012 Oct;18(10):1833-45. doi: 10.1261/rna.034942.112. Epub 2012 Aug 24. edition.
- Mackintosh SG, Raney KD. "DNA Unwinding and Protein Displacement by Superfamily 1 and Superfamily 2 Helicases.", *Nucleic Acids Res*. 2006;34(15):4154-9. Epub 2006 Aug 25. edition.
- Makino Y, Kanemaki M, Kurokawa Y, Koji T, Tamura Ta. "A Rat RuvB-like Protein, TIP49a, Is a Germ Cell-enriched Novel DNA Helicase.", *J Biol Chem*. 1999 May 28;274(22):15329-35. edition.
- Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M, Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T, Tamura T. "TIP49, Homologous to the Bacterial DNA Helicase RuvB, Acts as an Autoantigen in Human.", *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 28;245(3):819-23. edition.
- Malik HS, Henikoff S. "Phylogenomics of the Nucleosome.", *Nat Struct Biol*. 2003 Nov;10(11):882-91. edition.
- Malkov VA, Camerini-Otero RD. "Photocross-links Between Single-stranded DNA and Escherichia Coli RecA Protein Map to Loops L1 (amino Acid Residues 157-164) and L2 (amino Acid Residues 195-209).", *J Biol Chem*. 1995 Dec 15;270(50):30230-3. edition.
- Mancini EJ, Kainov DE, Grimes JM, Tuma R, Bamford DH, Stuart DI. "Atomic Snapshots of an RNA Packaging Motor Reveal Conformational Changes Linking ATP Hydrolysis to RNA Translocation.", *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):743-55. edition.
- March-Díaz R, García-Domínguez M, Lozano-Juste J, León J, Florencio FJ, Reyes JC. "Histone H2A.Z and Homologues of Components of the SWR1 Complex Are Required to Control Immunity in Arabidopsis.", *Plant J*. 2008 Feb;53(3):475-87. Epub 2007 Nov 6. edition.
- March-Díaz R, Reyes JC. "The Beauty of Being a Variant: H2A.Z and the SWR1 Complex in Plants.", *Mol Plant*. 2009 Jul;2(4):565-77. doi: 10.1093/mp/ssp019. Epub 2009 Mar 31. edition.
- Marfella CG, Imbalzano AN. "The Chd Family of Chromatin Remodelers.", *Mutat Res*. 2007 May 1;618(1-2):30-40. Epub 2007 Jan 21. edition.
- Marques M, Laflamme L, Gervais AL, Gaudreau L. "Reconciling the Positive and Negative Roles of Histone H2A.Z in Gene Transcription.", *Epigenetics*. 2010 May 16;5(4):267-72. Epub 2010 May 16. edition.
- Maslon MM, Hrstka R, Vojtesek B, Hupp TR. "A Divergent Substrate-binding Loop Within the Pro-oncogenic Protein Anterior Gradient-2 Forms a Docking Site for Reptin.", *J Mol Biol*. 2010 Dec 3;404(3):418-38. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.035. Epub 2010 Oct 1. edition.
- Matera AG, Terns RM, Terns MP. "Non-coding RNAs: Lessons from the Small Nuclear and Small Nucleolar RNAs.", *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):209-20. edition.
- Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA. "Crystal Structure of the Human AAA+ Protein RuvBL1.", *J Biol Chem*. 2006 Dec 15;281(50):38918-29. Epub 2006 Oct 23. edition.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. "ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage.", *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160-6. edition.

- Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, Zanton SJ, Tomsho LP, Qi J, Glaser RL, Schuster SC, Gilmour DS, Albert I, Pugh BF. "Nucleosome Organization in the Drosophila Genome.", *Nature*. 2008 May 15;453(7193):358-62. doi: 10.1038/nature06929. Epub 2008 Apr 13. edition.
- McGrew DA, Knight KL. "Molecular Design and Functional Organization of the RecA Protein.", *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2003;38(5):385-432. edition.
- McKeegan KS, Debieux CM, Boulon S, Bertrand E, Watkins NJ. "A Dynamic Scaffold of pre-snoRNP Factors Facilitates Human Box C/D snoRNP Assembly.", *Mol Cell Biol*. 2007 Oct;27(19):6782-93. Epub 2007 Jul 16. edition.
- McKeegan KS, Debieux CM, Watkins NJ. "Evidence That the AAA+ Proteins TIP48 and TIP49 Bridge Interactions Between 15.5K and the Related NOP56 and NOP58 Proteins During Box C/D snoRNP Biogenesis.", *Mol Cell Biol*. 2009 Sep;29(18):4971-81. doi: 10.1128/MCB.00752-09. Epub 2009 Jul 20. edition.
- Ménard L, Taras D, Grigoletto A, Haurie V, Nicou A, Dugot-Senant N, Costet P, Rousseau B, Rosenbaum J. "In Vivo Silencing of Reptin Blocks the Progression of Human Hepatocellular Carcinoma in Xenografts and Is Associated with Replicative Senescence.", *J Hepatol*. 2010 May;52(5):681-9. doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.029. Epub 2010 Mar 4. edition.
- Meneghini MD, Wu M, Madhani HD. "Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin.", *Cell*. 2003 Mar 7;112(5):725-36. edition.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. "LSD1 Demethylates Repressive Histone Marks to Promote Androgen-receptor-dependent Transcription.", *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):436-9. Epub 2005 Aug 3. edition.
- Millar CB, Xu F, Zhang K, Grunstein M. "Acetylation of H2AZ Lys 14 Is Associated with Genome-wide Gene Activity in Yeast.", *Genes Dev*. 2006 Mar 15;20(6):711-22. edition.
- Min J, Zhang Y, Xu RM. "Structural Basis for Specific Binding of Polycomb Chromodomain to Histone H3 Methylated at Lys 27.", *Genes Dev*. 2003 Aug 1;17(15):1823-8. edition.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. "ATP-driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex.", *Science*. 2004 Jan 16;303(5656):343-8. Epub 2003 Nov 26. edition.
- Monroy MA, Ruhl DD, Xu X, Granner DK, Yaciuk P, Chrivia JC. "Regulation of cAMP-responsive Element-binding Protein-mediated Transcription by the SNF2/SWI-related Protein, SRCAP.", *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):40721-6. Epub 2001 Aug 24. edition.
- Monroy MA, Schott NM, Cox L, Chen JD, Ruh M, Chrivia JC. "SNF2-related CBP Activator Protein (SRCAP) Functions as a Coactivator of Steroid Receptor-mediated Transcription through Synergistic Interactions with CARM-1 and GRIP-1.", *Mol Endocrinol*. 2003 Dec;17(12):2519-28. Epub 2003 Sep 18. edition.
- Morillon A, Karabetsov N, Nair A, Mellor J. "Dynamic Lysine Methylation on Histone H3 Defines the Regulatory Phase of Gene Transcription.", *Mol Cell*. 2005 Jun 10;18(6):723-34. edition.
- Morris NR. "A Comparison of the Structure of Chicken Erythrocyte and Chicken Liver Chromatin.", *Cell*. 1976 Dec;9(4 Pt 1):627-32. edition.
- Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X. "INO80 and gamma-H2AX Interaction Links ATP-dependent Chromatin Remodeling to DNA Damage Repair.", *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):767-75. edition.

- Morrison AJ, Kim JA, Person MD, Highland J, Xiao J, Wehr TS, Hensley S, Bao Y, Shen J, Collins SR, Weissman JS, Delrow J, Krogan NJ, Haber JE, Shen X. "Mec1/Tel1 Phosphorylation of the INO80 Chromatin Remodeling Complex Influences DNA Damage Checkpoint Responses.", *Cell*. 2007 Aug 10;130(3):499-511. edition.
- Moss SB, Challoner PB, Groudine M. "Expression of a Novel Histone 2B During Mouse Spermiogenesis.", *Dev Biol*. 1989 May;133(1):83-92. edition.
- Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ, Herceg Z. "Histone Acetylation by Trrap-Tip60 Modulates Loading of Repair Proteins and Repair of DNA Double-strand Breaks.", *Nat Cell Biol*. 2006 Jan;8(1):91-9. Epub 2005 Dec 11. edition.
- Murray K. "THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES.", *Biochemistry*. 1964 Jan;3:10-5. edition.
- Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D. "PP4 Is a Gamma H2AX Phosphatase Required for Recovery from the DNA Damage Checkpoint.", *EMBO Rep*. 2008 Oct;9(10):1019-26. doi: 10.1038/embor.2008.162. Epub 2008 Aug 29. edition.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL. "Histone Sumoylation Is a Negative Regulator in *Saccharomyces Cerevisiae* and Shows Dynamic Interplay with Positive-acting Histone Modifications.", *Genes Dev*. 2006 Apr 15;20(8):966-76. Epub 2006 Apr 5. edition.
- Nelson CJ, Santos-Rosa H, Kouzarides T. "Proline Isomerization of Histone H3 Regulates Lysine Methylation and Gene Expression.", *Cell*. 2006 Sep 8;126(5):905-16. edition.
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. "AAA+: A Class of Chaperone-like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes.", *Genome Res*. 1999 Jan;9(1):27-43. edition.
- Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA, Struhl K. "Lysine-79 of Histone H3 Is Hypomethylated at Silenced Loci in Yeast and Mammalian Cells: a Potential Mechanism for Position-effect Variegation.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1820-5. Epub 2003 Feb 6. edition.
- Nguyen VQ, Ranjan A, Stengel F, Wei D, Aebersold R, Wu C, Leschziner AE. "Molecular Architecture of the ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complex SWR1.", *Cell*. 2013 Sept 12;154:1220-1231 edition.
- Niewiarowski A, Bradley AS, Gor J, McKay AR, Perkins SJ, Tsaneva IR. "Oligomeric Assembly and Interactions Within the Human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 Complexes.", *Biochem J*. 2010 Jul 1;429(1):113-25. doi: 10.1042/BJ20100489. edition.
- Nikolova T, Ensminger M, Löbrich M, Kaina B. "Homologous Recombination Protects Mammalian Cells from Replication-associated DNA Double-strand Breaks Arising in Response to Methyl Methanesulfonate.", *DNA Repair (Amst)*. 2010 Oct 5;9(10):1050-63. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.07.005. Epub 2010 Aug 13. edition.
- Noll M. "Differences and Similarities in Chromatin Structure of *Neurospora Crassa* and Higher Eucaryotes.", *Cell*. 1976 Jul;8(3):349-55. edition.
- Nourani A, Doyon Y, Utley RT, Allard S, Lane WS, Côté J. "Role of an ING1 Growth Regulator in Transcriptional Activation and Targeted Histone Acetylation by the NuA4 Complex.", *Mol Cell Biol*. 2001 Nov;21(22):7629-40. edition.
- Nourani A, Utley RT, Allard S, Côté J. "Recruitment of the NuA4 Complex Poises the PHO5 Promoter for Chromatin Remodeling and Activation.", *EMBO J*. 2004 Jul 7;23(13):2597-607. Epub 2004 Jun 3. edition.

- Nowak SJ, Corces VG. "Phosphorylation of Histone H3: a Balancing Act Between Chromosome Condensation and Transcriptional Activation.", *Trends Genet.* 2004 Apr;20(4):214-20. edition.
- Nurse NP, Jimenez-Useche I, Smith IT, Yuan C. "Clipping of Flexible Tails of Histones H3 and H4 Affects the Structure and Dynamics of the Nucleosome.", *Biophys J.* 2013 Mar 5;104(5):1081-8. doi: 10.1016/j.bpj.2013.01.019. edition.
- Ohdate H, Lim CR, Kokubo T, Matsubara K, Kimata Y, Kohno K. "Impairment of the DNA Binding Activity of the TATA-binding Protein Renders the Transcriptional Function of Rvb2p/Tih2p, the Yeast RuvB-like Protein, Essential for Cell Growth.", *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14647-56. Epub 2003 Feb 6. edition.
- Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Krones A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, Taketo MM, Kemler R, Grosschedl R, Rose D, Li X, Rosenfeld MG. "Homeodomain-mediated Beta-catenin-dependent Switching Events Dictate Cell-lineage Determination.", *Cell.* 2006 May 5;125(3):593-605. edition.
- OncomineTM. "OncomineTM", <https://www.oncomine.org/> edition.
- Papamichos-Chronakis M, Krebs JE, Peterson CL. "Interplay Between Ino80 and Swr1 Chromatin Remodeling Enzymes Regulates Cell Cycle Checkpoint Adaptation in Response to DNA Damage.", *Genes Dev.* 2006 Sep 1;20(17):2437-49. edition.
- Papamichos-Chronakis M, Watanabe S, Rando OJ, Peterson CL. "Global Regulation of H2A.Z Localization by the INO80 Chromatin-remodeling Enzyme Is Essential for Genome Integrity.", *Cell.* 2011 Jan 21;144(2):200-13. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.021. edition.
- Papin C, Humbert O, Kalashnikova A, Eckert K, Morera S, Käs E, Grigoriev M. "3'- to 5' DNA Unwinding by TIP49b Proteins.", *FEBS J.* 2010 Jun;277(12):2705-14. edition.
- Parfait B, Giovangrandi Y, Asheuer M, Laurendeau I, Olivi M, Vodovar N, Vidaud D, Vidaud M, Bièche I. "Human TIP49b/RUVBL2 Gene: Genomic Structure, Expression Pattern, Physical Link to the Human CGB/LHB Gene Cluster on Chromosome 19q13.3.", *Ann Genet.* 2000 Apr-Jun;43(2):69-74. edition.
- Park EJ, Hur SK, Kwon J. "Human INO80 Chromatin-remodelling Complex Contributes to DNA Double-strand Break Repair via the Expression of Rad54B and XRCC3 Genes.", *Biochem J.* 2010 Oct 15;431(2):179-87. doi: 10.1042/BJ20100988. edition.
- Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ, Rakowski C, Chatterjee C, Lieberman PM, Lane WS, Blobel GA, McMahon SB. "The c-MYC Oncoprotein Is a Substrate of the Acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60.", *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10826-34. edition.
- Pelletier G, Stefanovsky VY, Faubladier M, Hirschler-Laszkiewicz I, Savard J, Rothblum LI, Côté J, Moss T. "Competitive Recruitment of CBP and Rb-HDAC Regulates UBF Acetylation and Ribosomal Transcription.", *Mol Cell.* 2000 Nov;6(5):1059-66. edition.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T. "Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin.", *Mol Cell.* 2003 Dec;12(6):1577-89. edition.
- Petukhov M, Dagkessamanskaja A, Bommer M, Barrett T, Tsaneva I, Yakimov A, Quéval R, Shvetsov A, Khodorkovskiy M, Käs E, Grigoriev M. "Large-scale Conformational Flexibility Determines the Properties of AAA+ TIP49 ATPases.", *Structure.* 2012 Aug 8;20(8):1321-31. doi: 10.1016/j.str.2012.05.012. Epub 2012 Jun 28. edition.
- Phillips Dm. "The Presence of Acetyl Groups of Histones.", *Biochem J.* 1963 May;87:258-63. edition.

- Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR. "Dodecameric Structure and ATPase Activity of the Human TIP48/TIP49 Complex.", *J Mol Biol.* 2007 Feb 9;366(1):179-92. Epub 2006 Nov 11. edition.
- Putnam CD, Clancy SB, Tsuruta H, Gonzalez S, Wetmur JG, Tainer JA. "Structure and Mechanism of the RuvB Holliday Junction Branch Migration Motor.", *J Mol Biol.* 2001 Aug 10;311(2):297-310. edition.
- Qiu XB, Lin YL, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, Parvin JD, Dutta A. "An Eukaryotic RuvB-like Protein (RUVBL1) Essential for Growth.", *J Biol Chem.* 1998 Oct 23;273(43):27786-93. edition.
- Radovic S, Rapisarda VA, Tosato V, Bruschi CV. "Functional and Comparative Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* RVB1 and RVB2 Genes with Bacterial Ruv Homologues.", *FEMS Yeast Res.* 2007 Jun;7(4):527-39. Epub 2007 Feb 16. edition.
- Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, Bao MZ, Liu CL, Schreiber SL, Rando OJ, Madhani HD. "Histone Variant H2A.Z Marks the 5' Ends of Both Active and Inactive Genes in Euchromatin.", *Cell.* 2005 Oct 21;123(2):233-48. edition.
- Ramakrishnan V. "The Histone Fold: Evolutionary Questions.", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 5;92(25):11328-30. edition.
- Rando OJ, Chang HY. "Genome-wide Views of Chromatin Structure.", *Annu Rev Biochem.* 2009;78:245-71. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.071107.134639. edition.
- Ranjan A, Mizuguchi G, Fitzgerald PC, Wei D, Wang F, Huang Y, Luk E, Woodcock CL, Wu C. "Nucleosome-free Region Dominates Histone Acetylation in Targeting SWR1 to Promoters for H2A.Z Replacement.", *Cell.* 2013 Sep 12;154(6):1232-45. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.005. edition.
- Rashid S, Pilecka I, Torun A, Olchowik M, Bielinska B, Miaczynska M. "Endosomal Adaptor Proteins APPL1 and APPL2 Are Novel Activators of beta-catenin/TCF-mediated Transcription.", *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18115-28. doi: 10.1074/jbc.M109.007237. Epub 2009 May 11. edition.
- Ray S, Grove A. "The Yeast High Mobility Group Protein HMO2, a Subunit of the Chromatin-remodeling Complex INO80, Binds DNA Ends.", *Nucleic Acids Res.* 2009 Oct;37(19):6389-99. doi: 10.1093/nar/gkp695. Epub 2009 Sep 2. edition.
- Reid JL, Iyer VR, Brown PO, Struhl K. "Coordinate Regulation of Yeast Ribosomal Protein Genes Is Associated with Targeted Recruitment of Esa1 Histone Acetylase.", *Mol Cell.* 2000 Dec;6(6):1297-307. edition.
- Ren J, Li W, Liu H, Yan L, Jiao W, Li D, Tang Y, Gu G, Xu Z. "Overexpression of Reptin in Renal Cell Carcinoma Contributes to Tumor Malignancies and Its Inhibition Triggers Senescence of Cancer Cells.", *Urol Oncol.* 2012 Feb 16. [Epub ahead of print] edition.
- Rhee HS, Pugh BF. "Genome-wide Structure and Organization of Eukaryotic Pre-initiation Complexes.", *Nature.* 2012 Jan 18;483(7389):295-301. doi: 10.1038/nature10799. edition.
- Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. "Structure of the Nucleosome Core Particle at 7 Å Resolution.", *Nature.* 1984 Oct 11-17;311(5986):532-7. edition.
- Robert F, Hardy S, Nagy Z, Baldeyron C, Murr R, Déry U, Masson JY, Papadopoulou D, Herceg Z, Tora L. "The Transcriptional Histone Acetyltransferase Cofactor TRRAP Associates with the MRN Repair Complex and Plays a Role in DNA Double-strand Break Repair.", *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(2):402-12. edition.
- Robert F, Pokholok DK, Hannett NM, Rinaldi NJ, Chandy M, Rolfe A, Workman JL, Gifford DK, Young RA. "Global Position and Recruitment of HATs and HDACs in the Yeast Genome.", *Mol Cell.* 2004 Oct 22;16(2):199-209. edition.

- Robyr D, Suka Y, Xenarios I, Kurdistani SK, Wang A, Suka N, Grunstein M. "Microarray Deacetylation Maps Determine Genome-wide Functions for Yeast Histone Deacetylases.", *Cell*. 2002 May 17;109(4):437-46. edition.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. "Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-strand Breaks in Vivo.", *J Cell Biol*. 1999 Sep 6;146(5):905-16. edition.
- Rosa M, Von Harder M, Cigliano RA, Schlögelhofer P, Mittelsten Scheid O. "The Arabidopsis SWR1 Chromatin-Remodeling Complex Is Important for DNA Repair, Somatic Recombination, and Meiosis.", *Plant Cell*. 2013 Jun;25(6):1990-2001. doi: 10.1105/tpc.112.104067. Epub 2013 Jun 18. edition.
- Rosenbaum J, Baek SH, Dutta A, Houry WA, Huber O, Hupp TR, Matias PM. "The Emergence of the Conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the Signaling Landscape.", *Sci Signal*. 2013 Mar 12;6(266):mr1. doi: 10.1126/scisignal.2003906. edition.
- Rottbauer W, Saurin AJ, Lickert H, Shen X, Burns CG, Wo ZG, Kemler R, Kingston R, Wu C, Fishman M. "Reptin and Pontin Antagonistically Regulate Heart Growth in Zebrafish Embryos.", *Cell*. 2002 Nov 27;111(5):661-72. edition.
- Rousseau B, Ménard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemièrre S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. "Overexpression and Role of the ATPase and Putative DNA Helicase RuvB-like 2 in Human Hepatocellular Carcinoma.", *Hepatology*. 2007 Oct;46(4):1108-18. edition.
- Ruhl DD, Jin J, Cai Y, Swanson S, Florens L, Washburn MP, Conaway RC, Conaway JW, Chrivia JC. "Purification of a Human SRCAP Complex That Remodels Chromatin by Incorporating the Histone Variant H2A.Z into Nucleosomes.", *Biochemistry*. 2006 May 2;45(17):5671-7. edition.
- Salzer U, Kubicek M, Prohaska R. "Isolation, Molecular Characterization, and Tissue-specific Expression of ECP-51 and ECP-54 (TIP49), Two Homologous, Interacting Erythroid Cytosolic Proteins.", *Biochim Biophys Acta*. 1999 Sep 3;1446(3):365-70. edition.
- San Filippo J, Sung P, Klein H. "Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination.", *Annu Rev Biochem*. 2008;77:229-57. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255. edition.
- Santisteban MS, Hang M, Smith MM. "Histone Variant H2A.Z and RNA Polymerase II Transcription Elongation.", *Mol Cell Biol*. 2011 May;31(9):1848-60. doi: 10.1128/MCB.01346-10. Epub 2011 Feb 28. edition.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. "Active Genes Are Tri-methylated at K4 of Histone H3.", *Nature*. 2002 Sep 26;419(6905):407-11. Epub 2002 Sep 11. edition.
- Sardiu ME, Cai Y, Jin J, Swanson SK, Conaway RC, Conaway JW, Florens L, Washburn MP. "Probabilistic Assembly of Human Protein Interaction Networks from Label-free Quantitative Proteomics.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 5;105(5):1454-9. doi: 10.1073/pnas.0706983105. Epub 2008 Jan 24. edition.
- Sarma K, Reinberg D. "Histone Variants Meet Their Match.", *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):139-49. edition.
- Schirling C, Heseding C, Heise F, Kesper D, Klebes A, Klein-Hitpass L, Vortkamp A, Hoffmann D, Saumweber H, Ehrenhofer-Murray AE. "Widespread Regulation of Gene Expression in the Drosophila Genome by the Histone Acetyltransferase dTip60.", *Chromosoma*. 2010 Feb;119(1):99-113. doi: 10.1007/s00412-009-0247-z. Epub 2009 Dec 1. edition.

- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. "A Silencing Pathway to Induce H3-K9 and H4-K20 Trimethylation at Constitutive Heterochromatin.", *Genes Dev.* 2004 Jun 1;18(11):1251-62. Epub 2004 May 14. edition.
- Schwabish MA, Struhl K. "Evidence for Eviction and Rapid Deposition of Histones Upon Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II.", *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(23):10111-7. edition.
- Shahbazian MD, Grunstein M. "Functions of Site-specific Histone Acetylation and Deacetylation.", *Annu Rev Biochem.* 2007;76:75-100. edition.
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. "Extraction, Purification and Analysis of Histones.", *Nat Protoc.* 2007;2(6):1445-57. edition.
- Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. "A Chromatin Remodelling Complex Involved in Transcription and DNA Processing.", *Nature.* 2000 Aug 3;406(6795):541-4. edition.
- Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C. "Involvement of Actin-related Proteins in ATP-dependent Chromatin Remodeling.", *Mol Cell.* 2003 Jul;12(1):147-55. edition.
- Shi L, Oberdoerffer P. "Chromatin Dynamics in DNA Double-strand Break Repair.", *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jul;1819(7):811-9. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.01.002. Epub 2012 Jan 17. edition.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. "Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1.", *Cell.* 2004 Dec 29;119(7):941-53. edition.
- Shilatifard A. "Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression.", *Annu Rev Biochem.* 2006;75:243-69. edition.
- Shim EY, Hong SJ, Oum JH, Yanez Y, Zhang Y, Lee SE. "RSC Mobilizes Nucleosomes to Improve Accessibility of Repair Machinery to the Damaged Chromatin.", *Mol Cell Biol.* 2007 Mar;27(5):1602-13. Epub 2006 Dec 18. edition.
- Shimada K, Oma Y, Schleker T, Kugou K, Ohta K, Harata M, Gasser SM. "Ino80 Chromatin Remodeling Complex Promotes Recovery of Stalled Replication Forks.", *Curr Biol.* 2008 Apr 22;18(8):566-75. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.049. Epub 2008 Apr 10. edition.
- Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, Lichten M. "Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-strand Break.", *Curr Biol.* 2004 Oct 5;14(19):1703-11. edition.
- Si J, Yu X, Zhang Y, DeWille JW. "Myc Interacts with Max and Miz1 to Repress C/EBPdelta Promoter Activity and Gene Expression.", *Mol Cancer.* 2010 Apr 28;9:92. doi: 10.1186/1476-4598-9-92. edition.
- Sigala B, Edwards M, Puri T, Tsaneva IR. "Relocalization of Human Chromatin Remodeling Cofactor TIP48 in Mitosis.", *Exp Cell Res.* 2005 Nov 1;310(2):357-69. Epub 2005 Sep 12. edition.
- Simpson RT. "Structure of the Chromatosome, a Chromatin Particle Containing 160 Base Pairs of DNA and All the Histones.", *Biochemistry.* 1978 Dec 12;17(25):5524-31. edition.
- Smith MM. "Centromeres and Variant Histones: What, Where, When and Why?", *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Jun;14(3):279-85. edition.
- Snider J, Houry WA. "AAA+ Proteins: Diversity in Function, Similarity in Structure.", *Biochem Soc Trans.* 2008 Feb;36(Pt 1):72-7. doi: 10.1042/BST0360072. edition.
- Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, Snyder M, Oliver SG, Cyert M, Hughes TR, Boone C, Andrews B. "Mapping Pathways and Phenotypes by Systematic Gene Overexpression.", *Mol Cell.* 2006 Feb 3;21(3):319-30. edition.

- Spadafora C, Bellard M, Compton JL, Chambon P. "The DNA Repeat Lengths in Chromatins from Sea Urchin Sperm and Gastrule Cells Are Markedly Different.", *FEBS Lett*. 1976 Oct 15;69(1):281-5. edition.
- Sterner DE, Berger SL. "Acetylation of Histones and Transcription-related Factors.", *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Jun;64(2):435-59. edition.
- Stinson BM, Nager AR, Glynn SE, Schmitz KR, Baker TA, Sauer RT. "Nucleotide Binding and Conformational Switching in the Hexameric Ring of a AAA+ Machine.", *Cell*. 2013 Apr 25;153(3):628-39. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.029. edition.
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. "A Role for the Tip60 Histone Acetyltransferase in the Acetylation and Activation of ATM.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 13;102(37):13182-7. Epub 2005 Sep 2. edition.
- Sun Y, Jiang X, Xu Y, Ayrapetov MK, Moreau LA, Whetstine JR, Price BD. "Histone H3 Methylation Links DNA Damage Detection to Activation of the Tumour Suppressor Tip60.", *Nat Cell Biol*. 2009 Nov;11(11):1376-82. doi: 10.1038/ncb1982. Epub 2009 Sep 27. edition.
- Suzuki MM, Bird A. "DNA Methylation Landscapes: Provocative Insights from Epigenomics.", *Nat Rev Genet*. 2008 Jun;9(6):465-76. doi: 10.1038/nrg2341. edition.
- Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. "Acetylation of the P53 DNA-binding Domain Regulates Apoptosis Induction.", *Mol Cell*. 2006 Dec 28;24(6):841-51. edition.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. "HSP90 at the Hub of Protein Homeostasis: Emerging Mechanistic Insights.", *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jul;11(7):515-28. doi: 10.1038/nrm2918. Epub 2010 Jun 9. edition.
- Tamkun JW. "The Role of Brahma and Related Proteins in Transcription and Development.", *Curr Opin Genet Dev*. 1995 Aug;5(4):473-7. edition.
- Tang J, Cho NW, Cui G, Manion EM, Shanbhag NM, Botuyan MV, Mer G, Greenberg RA. "Acetylation Limits 53BP1 Association with Damaged Chromatin to Promote Homologous Recombination.", *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Mar;20(3):317-25. doi: 10.1038/nsmb.2499. Epub 2013 Feb 3. edition.
- Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. "Tip60-dependent Acetylation of P53 Modulates the Decision Between Cell-cycle Arrest and Apoptosis.", *Mol Cell*. 2006 Dec 28;24(6):827-39. edition.
- Taubert S, Gorrini C, Frank SR, Parisi T, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B. "E2F-dependent Histone Acetylation and Recruitment of the Tip60 Acetyltransferase Complex to Chromatin in Late G1.", *Mol Cell Biol*. 2004 May;24(10):4546-56. edition.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. "How Chromatin-binding Modules Interpret Histone Modifications: Lessons from Professional Pocket Pickers.", *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Nov;14(11):1025-40. Epub 2007 Nov 5. edition.
- Thåström A, Lowary PT, Widlund HR, Cao H, Kubista M, Widom J. "Sequence Motifs and Free Energies of Selected Natural and Non-natural Nucleosome Positioning DNA Sequences.", *J Mol Biol*. 1999 Apr 30;288(2):213-29. edition.
- Thomas JO, Thompson RJ. "Variation in Chromatin Structure in Two Cell Types from the Same Tissue: a Short DNA Repeat Length in Cerebral Cortex Neurons.", *Cell*. 1977 Apr;10(4):633-40. edition.
- Thomsen ND, Berger JM. "Running in Reverse: The Structural Basis for Translocation Polarity in Hexameric Helicases.", *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):523-34. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.043. edition.

- Torreira E, Jha S, López-Blanco JR, Arias-Palomo E, Chacón P, Cañas C, Ayora S, Dutta A, Llorca O. "Architecture of the Pontin/reptin Complex, Essential in the Assembly of Several Macromolecular Complexes.", *Structure*. 2008 Oct 8;16(10):1511-20. doi: 10.1016/j.str.2008.08.009. edition.
- Tosi A, Haas C, Herzog F, Gilmozzi A, Berninghausen O, Ungewickell C, Gerhold CB, Lakomek K, Aebersold R, Beckmann R, Hopfner K-P. "Structure and Subunit Topology of the INO80 Chromatin Remodeler and Its Nucleosome Complex.", *Cell*. 2013 Sept 12;154:1207-1219 edition.
- Travers AA. "Why Bend DNA?", *Cell*. 1990 Jan 26;60(2):177-80. edition.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. "Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-containing Proteins.", *Nature*. 2006 Feb 16;439(7078):811-6. Epub 2005 Dec 18. edition.
- Tsukuda T, Fleming AB, Nickoloff JA, Osley MA. "Chromatin Remodelling at a DNA Double-strand Break Site in *Saccharomyces Cerevisiae*.", *Nature*. 2005 Nov 17;438(7066):379-83. edition.
- Tsukuda T, Lo YC, Krishna S, Sterk R, Osley MA, Nickoloff JA. "INO80-dependent Chromatin Remodeling Regulates Early and Late Stages of Mitotic Homologous Recombination.", *DNA Repair (Amst)*. 2009 Mar 1;8(3):360-9. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.11.014. Epub 2009 Jan 3. edition.
- Urbacher EC, Bunick GJ. "Structure of the Nucleosome Core Particle at 8 Å Resolution.", *J Biomol Struct Dyn*. 1989 Aug;7(1):1-18. edition.
- Udugama M, Sabri A, Bartholomew B. "The INO80 ATP-dependent Chromatin Remodeling Complex Is a Nucleosome Spacing Factor.", *Mol Cell Biol*. 2011 Feb;31(4):662-73. doi: 10.1128/MCB.01035-10. Epub 2010 Dec 6. edition.
- Utlei RT, Ikeda K, Grant PA, Côté J, Steger DJ, Eberharter A, John S, Workman JL. "Transcriptional Activators Direct Histone Acetyltransferase Complexes to Nucleosomes.", *Nature*. 1998 Jul 30;394(6692):498-502. edition.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. "Requirement of the MRN Complex for ATM Activation by DNA Damage.", *EMBO J*. 2003 Oct 15;22(20):5612-21. edition.
- van Attikum H, Fritsch O, Gasser SM. "Distinct Roles for SWR1 and INO80 Chromatin Remodeling Complexes at Chromosomal Double-strand Breaks.", *EMBO J*. 2007 Sep 19;26(18):4113-25. Epub 2007 Aug 30. edition.
- van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM. "Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-strand Break Repair.", *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):777-88. edition.
- Vannini A, Cramer P. "Conservation Between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries.", *Mol Cell*. 2012 Feb 24;45(4):439-46. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.023. edition.
- Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE. "Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly.", *Cell*. 2008 Mar 21;132(6):945-57. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.019. edition.
- Vignali M, Steger DJ, Neely KE, Workman JL. "Distribution of Acetylated Histones Resulting from Gal4-VP16 Recruitment of SAGA and NuA4 Complexes.", *EMBO J*. 2000 Jun 1;19(11):2629-40. edition.
- Vilenchik MM, Knudson AG. "Endogenous DNA Double-strand Breaks: Production, Fidelity of Repair, and Induction of Cancer.", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):12871-6. Epub 2003 Oct 17. edition.

- Wang A, Kurdistani SK, Grunstein M. "Requirement of Hos2 Histone Deacetylase for Gene Activity in Yeast.", *Science*. 2002 Nov 15;298(5597):1412-4. edition.
- Wang CW, Chen WC, Lin LJ, Lee CT, Tseng TH, Leu WM. "OIP30, a RuvB-like DNA Helicase 2, Is a Potential Substrate for the Pollen-predominant OsCPK25/26 in Rice.", *Plant Cell Physiol*. 2011 Sep;52(9):1641-56. doi: 10.1093/pcp/pcr094. Epub 2011 Jul 19. edition.
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. "Role of Histone H2A Ubiquitination in Polycomb Silencing.", *Nature*. 2004 Oct 14;431(7010):873-8. Epub 2004 Sep 22. edition.
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y. "Histone H3 and H4 Ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 Ubiquitin Ligase Facilitates Cellular Response to DNA Damage.", *Mol Cell*. 2006 May 5;22(3):383-94. edition.
- Wang Y, Adzuma K. "Differential Proximity Probing of Two DNA Binding Sites in the Escherichia Coli recA Protein Using Photo-cross-linking Methods.", *Biochemistry*. 1996 Mar 19;35(11):3563-71. edition.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA. "Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethyliminination.", *Science*. 2004 Oct 8;306(5694):279-83. Epub 2004 Sep 2. edition.
- Watkins NJ, Dickmanns A, Lührmann R. "Conserved Stem II of the Box C/D Motif Is Essential for Nucleolar Localization and Is Required, Along with the 15.5K Protein, for the Hierarchical Assembly of the Box C/D snoRNP.", *Mol Cell Biol*. 2002 Dec;22(23):8342-52. edition.
- Watkins NJ, Lemm I, Ingelfinger D, Schneider C, Hossbach M, Urlaub H, Lührmann R. "Assembly and Maturation of the U3 snoRNP in the Nucleoplasm in a Large Dynamic Multiprotein Complex.", *Mol Cell*. 2004 Dec 3;16(5):789-98. edition.
- Watkins NJ, Lemm I, Lührmann R. "Involvement of Nuclear Import and Export Factors in U8 Box C/D snoRNP Biogenesis.", *Mol Cell Biol*. 2007 Oct;27(20):7018-27. Epub 2007 Aug 20. edition.
- Watkins NJ, Ségault V, Charpentier B, Nottrott S, Fabrizio P, Bachi A, Wilm M, Rosbash M, Branlant C, Lührmann R. "A Common Core RNP Structure Shared Between the Small Nucleolar Box C/D RNPs and the Spliceosomal U4 snRNP.", *Cell*. 2000 Oct 27;103(3):457-66. edition.
- Weber CM, Henikoff JG, Henikoff S. "H2A.Z Nucleosomes Enriched over Active Genes Are Homotypic.", *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Dec;17(12):1500-7. doi: 10.1038/nsmb.1926. Epub 2010 Nov 7. edition.
- Weiske J, Huber O. "The Histidine Triad Protein Hint1 Interacts with Pontin and Reptin and Inhibits TCF-beta-catenin-mediated Transcription.", *J Cell Sci*. 2005 Jul 15;118(Pt 14):3117-29. edition.
- Wendler P, Ciniawsky S, Kock M, Kube S. "Structure and Function of the AAA+ Nucleotide Binding Pocket.", *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1823(1):2-14. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.06.014. Epub 2011 Jul 28. edition.
- Widlund HR, Vitolo JM, Thiriet C, Hayes JJ. "DNA Sequence-dependent Contributions of Core Histone Tails to Nucleosome Stability: Differential Effects of Acetylation and Proteolytic Tail Removal.", *Biochemistry*. 2000 Apr 4;39(13):3835-41. edition.
- Widom J. "Chromatin: The Nucleosome Unwrapped.", *Curr Biol*. 1997 Oct 1;7(10):R653-5. edition.

- Williams SK, Tyler JK. "Transcriptional Regulation by Chromatin Disassembly and Reassembly.", *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Apr;17(2):88-93. Epub 2007 Feb 20. edition.
- Winkler DD, Luger K. "The Histone Chaperone FACT: Structural Insights and Mechanisms for Nucleosome Reorganization.", *J Biol Chem*. 2011 May 27;286(21):18369-74. doi: 10.1074/jbc.R110.180778. Epub 2011 Mar 24. edition.
- Wong MM, Cox LK, Chrivia JC. "The Chromatin Remodeling Protein, SRCAP, Is Critical for Deposition of the Histone Variant H2A.Z at Promoters.", *J Biol Chem*. 2007 Sep 7;282(36):26132-9. Epub 2007 Jul 8. edition.
- Wood MA, McMahon SB, Cole MD. "An ATPase/helicase Complex Is an Essential Cofactor for Oncogenic Transformation by c-Myc.", *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):321-30. edition.
- Wu S, Shi Y, Mulligan P, Gay F, Landry J, Liu H, Lu J, Qi HH, Wang W, Nickoloff JA, Wu C, Shi Y. "A YY1-INO80 Complex Regulates Genomic Stability through Homologous Recombination-based Repair.", *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Dec;14(12):1165-72. Epub 2007 Nov 18. edition.
- Wu WH, Alami S, Luk E, Wu CH, Sen S, Mizuguchi G, Wei D, Wu C. "Swc2 Is a Widely Conserved H2AZ-binding Module Essential for ATP-dependent Histone Exchange.", *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Dec;12(12):1064-71. Epub 2005 Nov 20. edition.
- Wu WH, Wu CH, Ladurner A, Mizuguchi G, Wei D, Xiao H, Luk E, Ranjan A, Wu C. "N Terminus of Swr1 Binds to Histone H2AZ and Provides a Platform for Subunit Assembly in the Chromatin Remodeling Complex.", *J Biol Chem*. 2009 Mar 6;284(10):6200-7. doi: 10.1074/jbc.M808830200. Epub 2008 Dec 16. edition.
- Xiao H, Chung J, Kao HY, Yang YC. "Tip60 Is a Co-repressor for STAT3.", *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11197-204. Epub 2003 Jan 27. edition.
- Xie X, Kokubo T, Cohen SL, Mirza UA, Hoffmann A, Chait BT, Roeder RG, Nakatani Y, Burley SK. "Structural Similarity Between TAFs and the Heterotetrameric Core of the Histone Octamer.", *Nature*. 1996 Mar 28;380(6572):316-22. edition.
- Xu F, Zhang K, Grunstein M. "Acetylation in Histone H3 Globular Domain Regulates Gene Expression in Yeast.", *Cell*. 2005 May 6;121(3):375-85. edition.
- Xu Y, Sun Y, Jiang X, Ayrapetov MK, Moskwa P, Yang S, Weinstock DM, Price BD. "The P400 ATPase Regulates Nucleosome Stability and Chromatin Ubiquitination During DNA Repair.", *J Cell Biol*. 2010 Oct 4;191(1):31-43. doi: 10.1083/jcb.201001160. Epub 2010 Sep 27. edition.
- Yao T, Song L, Jin J, Cai Y, Takahashi H, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Cohen RE, Conaway JW. "Distinct Modes of Regulation of the Uch37 Deubiquitinating Enzyme in the Proteasome and in the Ino80 Chromatin-remodeling Complex.", *Mol Cell*. 2008 Sep 26;31(6):909-17. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.027. edition.
- Yen K, Vinayachandran V, Batta K, Koerber RT, Pugh BF. "Genome-wide Nucleosome Specificity and Directionality of Chromatin Remodelers.", *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1461-73. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.036. edition.
- Yen K, Vinayachandran V, Pugh BF. "SWR-C and INO80 Chromatin Remodelers Recognize Nucleosome-free Regions Near +1 Nucleosomes.", *Cell*. 2013 Sep 12;154(6):1246-56. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.043. edition.
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. "ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1.", *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5363-79. edition.
- Yu EY, Steinberg-Neifach O, Dandjinou AT, Kang F, Morrison AJ, Shen X, Lue NF. "Regulation of Telomere Structure and Functions by Subunits of the INO80

- Chromatin Remodeling Complex.”, *Mol Cell Biol*. 2007 Aug;27(16):5639-49. Epub 2007 Jun 11. edition.
- Yuan J, Adamski R, Chen J. “Focus on Histone Variant H2AX: To Be or Not to Be.”, *FEBS Lett*. 2010 Sep 10;584(17):3717-24. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.021. Epub 2010 May 21. edition.
- Zhang H, Roberts DN, Cairns BR. “Genome-wide Dynamics of Htz1, a Histone H2A Variant That Poises Repressed/basal Promoters for Activation through Histone Loss.”, *Cell*. 2005 Oct 21;123(2):219-31. edition.
- Zhang Y, Reinberg D. “Transcription Regulation by Histone Methylation: Interplay Between Different Covalent Modifications of the Core Histone Tails.”, *Genes Dev*. 2001 Sep 15;15(18):2343-60. edition.
- Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, Boone C, Emili A, Houry WA. “Navigating the Chaperone Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone.”, *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):715-27. edition.
- Zhao R, Kakihara Y, Gribun A, Huen J, Yang G, Khanna M, Costanzo M, Brost RL, Boone C, Hughes TR, Yip CM, Houry WA. “Molecular Chaperone Hsp90 Stabilizes Pih1/Nop17 to Maintain R2TP Complex Activity That Regulates snoRNA Accumulation.”, *J Cell Biol*. 2008 Feb 11;180(3):563-78. doi: 10.1083/jcb.200709061. edition.

Les hélicases ATP-dépendantes Pontin et Reptin sont nécessaires aux activités de nombreux complexes protéiques, en particulier des complexes de remodelage de la chromatine ou des assemblages de facteurs de transcription. Néanmoins, aucun lien n'a encore été défini entre les propriétés biochimiques des protéines Pontin et Reptin et leurs fonctions *in vivo*. Nous avons étudié l'impact de l'unité de base de la chromatine, le nucléosome, sur les activités biochimiques des protéines Pontin et Reptin. Un pré-requis pour cette étude a été la purification des protéines Pontin et Reptin, sous leur forme monomérique ou hexamérique, et des histones, corps protéiques des nucléosomes. Il a également été nécessaire d'optimiser la reconstitution *in vitro* de mononucléosomes. Avec ces outils, nous avons identifié un effet fonctionnel des nucléosomes sur l'activité des protéines Pontin et Reptin qui vient compléter une interaction physique entre Pontin ou Reptin et les nucléosomes. Les protéines Pontin et Reptin forment un complexe stable avec des mononucléosomes lequel dépend de la région N-terminale de l'histone H3. Nous montrons que l'activité ATPase ADN-dépendante des protéines Pontin et Reptin est modulée différemment par l'extrémité N-terminale d'H3 suivant qu'elle porte ou non des modifications post-traductionnelles. Corrélié à cela, ces mêmes extrémités N-terminales d'H3 régulent l'état d'oligomérisation des protéines Pontin et Reptin. De plus, le profil des protéines co-immunoprécipitées avec les monomères de Pontin ou Reptin diffère de celui obtenu avec les formes hexamériques. Nous proposons que les protéines Pontin et Reptin constituent une plateforme moléculaire de recrutement pour des facteurs protéiques, et, au-delà, coordonnent ce recrutement des différents partenaires par des changements de leurs états oligomériques eux-mêmes régulés par leur interaction avec la région N-terminale de l'histone H3.

The Pontin and Reptin DNA-dependent ATPases are both necessary for activity of numerous cellular complexes, in particular chromatin remodeling complexes or transcription factor assemblies. However, no link has yet been defined between the biochemical properties of Pontin and Reptin and these *in vivo* functions. We have studied the impact of the chromatin base unit, the nucleosome, on the biochemical activities Pontin and Reptin. A prerequisite for this was the purification of Pontin and Reptin proteins either as monomers or in hexameric form, and of histones, the protein cores of nucleosomes. It was also necessary to optimize mononucleosome reconstitution *in vitro*. With these tools, we identified a functional effect of the nucleosome on Pontin and Reptin activity which complemented its physical interaction with nucleosomes. Pontin or Reptin proteins form a stable complex with mononucleosomes which depends on the N-terminal region of histone H3. We show that the Pontin and Reptin DNA-dependent ATPase activity is modulated differentially by the N-terminus tail of H3 and that this depends on whether or not the tail carries post-translational modifications. Correlated with this, the H3 N-terminus also regulates Pontin and Reptin oligomerization. Moreover the profile of proteins which co-immunoprecipitate with Pontin or Reptin monomers is different to that found with the hexameric forms. We propose that Pontin and Reptin proteins could constitute a molecular platform for loading interacting proteins. And furthermore that Pontin and Reptin coordinates recruitment of different proteins by changes in its oligomerisation state in turn regulated by its interaction with the N-terminal region of histone H3.